

Untersuchungen zur Virustatikaempfindlichkeit von Influenza-A-Viren vom Subtyp H1

DISSERTATION

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin Katja Bauer

geboren am 26. September 1981 in Schmölln

Jena, 2010

Gutachter:

Prof. Dr. med. habil. Peter Wutzler

Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Universitätsklinikum Jena

Prof. Dr. med. habil. Wolfgang Pfister

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Jena

PD Dr. phil. nat. Dr. med. habil. Martin Michaelis

Institut für Medizinische Virologie,

Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

Tag der öffentlichen Disputation: 16. März 2011

Abkürzungsverzeichnis

A/H1N1v	pandemisches Influenza-A-Virus
APAAP	Alkalische Phosphatase-anti Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäure/n
CDC	<i>Centers of Disease Control and Prevention</i>
cDNA	komplementäre DNA
cRNA	komplementäre RNA
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FKS	fetales Kälberserum
FLUAV	Influenza-A-Viren
HA	Hämagglutinin
HAU	hämagglutinierende Einheit (<i>hämagglutinating unit</i>)
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HI-AK	hämagglutinationsinhibierende Antikörper
hp	hochpassagiert
HPAIV	hochpathogene aviäre Influenza-A-Viren (<i>high pathogenic avian influenza viruses</i>)
huH1N1 bzw. H1N2	humane Viren des Subtyps H1N1 bzw. H1N2
huFLUAV	humane Influenza-A-Viren
IC ₅₀	50%ige Hemmwirkung
IQR	<i>interquartile range</i>
LPAIV	niedrigpathogene Influenza-A-Viren (<i>low pathogenic avian influenza viruses</i>)
MDBK	Rindernierenzellen (<i>Madin Darby Bovine Kidney</i>)
MDCK	Hundenierenzellen (<i>Madin Darby Canine Kidney</i>)
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger-RNA</i>)
n	Stichprobenmenge
NA	Neuraminidase
NAI	Neuraminidaseinhibitor/en
NEAA	nichtessentielle Aminosäuren
NeuAc	N-Acetylneuraminsäure
NHBE	normale humane Bronchialtrachealepithelzellen (<i>normal human bronchial/tracheal epithelial</i>)

Abkürzungsverzeichnis

NP	Nukleoprotein
NS	Nukleinsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
p. i.	<i>post infectionem</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
RSA	Rinderserumalbumin
RT	Reverse Transkription
swH1N1 bzw. H1N2	porzine Viren des Subtyps H1N1 bzw. H1N2
swFLUAV	Schweine-Influenza-A-Viren
TCID ₅₀	50%ige Zellkulturinfektionsdosis (<i>50 % tissue culture infectious dose</i>)
vRNA	virale RNA
WHO	Weltgesundheitsorganisation
zpE	zytopathischer Effekt

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Theoretische Grundlagen	5
2.1	Influenzaviren	5
2.2	Epidemiologie der Influenza-A-Viren	9
2.3	Klinik, Pathogenese und Diagnostik der Grippe	14
2.4	Grippeprophylaxe	16
2.5	Chemotherapie der Influenza	18
3	Ziele der vorliegenden Arbeit.....	22
4	Materialien	24
4.1	Zelllinien	24
4.2	Viren	24
4.3	Oligonukleotide.....	29
4.4	Chemikalien und Grundstoffe	30
4.5	Puffer und Lösungen	34
5	Methoden.....	35
5.1	Methoden für die Zellkultur und virologische Arbeiten.....	35
5.1.1	Zellkultivierung.....	35
5.1.2	Färbung und Fixierung von Zellen.....	35
5.1.3	Virusvermehrung	36
5.1.4	Quantitativer Virusnachweis	36
5.1.5	Methoden für Dosis-Wirkungs-Untersuchungen.....	37
5.2	<i>In vivo</i> -Untersuchungen im Mausmodell	39
5.2.1	Virusinfektion und Sektionen	39
5.2.2	Organaufarbeitung für Virustiterbestimmung.....	40
5.2.3	Hämagglutinationshemmtest	41
5.2.4	Histologie.....	41
5.2.5	Nachweis viraler RNA mittels <i>In situ</i> -Hybridisierung	42
5.2.6	Antivirale Behandlung mit Oseltamivir-Phosphat <i>in vivo</i>	42
5.3	Antivirale Wirksamkeit von Tamiflu® im Schwein	42
5.4	Immunhistochemische Nachweismethoden	44
5.4.1	Nachweis des viralen Nukleoproteins.....	44
5.4.2	Ziliennachweis	44
5.4.3	Detektion spezifischer Sialinsäurereste auf Zellen	45
5.5	FACS-Analysen zur Quantifizierung spezifischer Sialinsäurereste auf Zellen	46
5.6	Methoden für molekularbiologische Arbeiten	46
5.6.1	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese.....	46
5.6.2	Polymerasekettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese	47

5.6.3	Reinigung der PCR-Produkte und Sequenzierung	49
5.7	Statistische Auswertungen	50
6	Ergebnisse.....	51
6.1	Virustatikaempfindlichkeit porziner und humaner Influenza-A-Viren <i>in vitro</i>	51
6.1.1	Empfindlichkeit der Influenza-A-Viren gegenüber Amantadin	52
6.1.2	Wirkung von Oseltamivir und Zanamivir gegenüber den Influenza-A-Viren..	54
6.2	Phylogenetische Verwandtschaft porziner und humaner Influenza-A-Viren des Subtyps H1 im M2-, HA- und NA-Protein	68
6.3	Oseltamivirempfindlichkeit ausgewählter porziner und humaner Influenza-A-Viren <i>in vivo</i>	74
6.3.1	Etablierung eines Mausmodells zur Infektion weiblicher BALB/c-Mäuse mit humanen und porzinen Influenza-A-Viren des Subtyps H1	75
6.3.2	Antivirale Behandlung A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“- bzw. „Dessau“- infizierter weiblicher BALB/c-Mäuse mit Oseltamivir.....	83
6.3.3	Antivirale Therapie A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2)-infizierter weiblicher BALB/c-Mäuse mit Oseltamivir	87
6.3.4	Antivirale Behandlung A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2)-infizierter Schweine mit Tamiflu®	90
7	Diskussion	94
7.1	Empfindlichkeit der Influenza-A-Viren gegenüber den existierenden Substanzklassen	94
7.2	Etablierung eines Mausmodells für Untersuchungen zur Empfindlichkeit humaner und porziner Influenza-A-Viren <i>in vivo</i>	104
7.3	Oseltamivirempfindlichkeit von A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2) in der Maus und im Schwein	107
7.4	Einfluss der Rezeptorpräferenz der A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-Isolate auf die NAI-Empfindlichkeit <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	110
	Literaturverzeichnis	115

1 Zusammenfassung

Mit Auftreten der A/H1N1v-Influenzapandemie im Frühjahr 2009 wurde deutlich, welches Potential in Virusvarianten steckt, die durch Reassortierung humaner, aviärer und porciner Viren entstehen. Diese Influenza-A-Viren (FLUAV) tragen sowohl die Neuraminidase (NA) als auch das M-Protein der eurasischen Schweine-FLUAV (swFLUAV). Diese beiden Proteine sind im Hinblick auf die antivirale Therapie der Grippe von besonderer Bedeutung, da sie die Targets der beiden derzeit zugelassenen Virustatikaklassen – Adamantanamine und Neuraminidaseinhibitoren (NAI) – darstellen. Obwohl Schweinen als *mixing vessel* eine große Bedeutung bei der Entstehung neuer Virusvarianten zukommt, war bis zum Ausbruch der Pandemie nur wenig über die Suszeptibilität von swFLUAV gegenüber den existierenden antiviralen Medikamenten bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden 31 humane FLUAV (huFLUAV) und 74 swFLUAV der Subtypen H1N1 und H1N2 (zwischen 1981 und 2006 in Deutschland isoliert) hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber dem M2-Ionenkanalblocker Amantadin und den beiden NAI Oseltamivir und Zanamivir untersucht. Während alle humanen Isolate im Geno- und Phänotyp Amantadin-sensitiv waren, weisen die ab 1989 isolierten porcinen Stämme die Substitution S31N im M2-Protein auf. Diese Mutation vermittelt eine Amantadinresistenz, was durch Plaquereduktionsteste ausgewählter Isolate in MDCK-Zellen bestätigt wurde. Eine Übertragung des resistenten M2-Proteins von den swFLUAV auf die humanen Isolate konnte in phylogenetischen Analysen vor Auftreten der A/H1N1v-Pandemie nicht nachgewiesen werden.

Mit dem Neuraminidasehemmtest wurde direkt die Empfindlichkeit des viralen Glykoproteins gegenüber den NA-Hemmern Oseltamivir und Zanamivir bestimmt. Alle untersuchten FLUAV erwiesen sich als sensitiv. Differenzen zwischen der Suszeptibilität in diesem Test und den mit ausgewählten FLUAV durchgeführten zellkulturbasierten Plaquereduktions- und Virusertragshemmtesten wurden für A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ sowie die H1N2-Isolate A/swine/Bakum/1832/00 und A/swine/Bakum/1833/00 ermittelt. Diese Unterschiede ließen sich in Experimenten zum Einfluss der NAI auf die Virusausbreitung in MDCK-Zellen bestätigen, in denen das virale Nukleoprotein immunhistochemisch nachgewiesen wurde. Weder Oseltamivir noch Zanamivir verhinderten die Neuinfektion benachbarter Zellen durch diese drei Viren.

Die intransasale Inokulation weiblicher BALB/c-Mäuse mit zwei ausgewählten huFLUAV verlief weitestgehend subklinisch, während die Influenzaerkrankung mit porcinen Virusisolaten in diesem Modell von Körpergewichtsverlusten, der Verschlechterung des Allgemeinbefindens, hohen Virustitern in den Lungen und Tracheen sowie histologischen Veränderungen in den Lungen gekennzeichnet war. Die Pathogenität der FLUAV in der

Maus korrelierte mit der Rezeptorbindungsspezifität sowie der Anzahl potentieller N-Glykosylierungsstellen im Hämagglutinin (HA). Die Überexpression $\alpha 2,3$ -verknüpfter Sialinsäurerezeptoren sowohl im oberen als auch im unteren Respirationstrakt der Mäuse ermöglichte eine effizientere Vermehrung von swFLUAV mit *avian-like* HA. Trotz einer um den Faktor 10 höheren Inokulationsdosis resultierte die Infektion mit höher glykosylierten Stämmen in einer geringeren Morbidität. Die Infektionen verliefen nicht letal und die Körpergewichtsverluste, Lungenschäden sowie Krankheitssymptome waren weniger ausgeprägt.

Die Etablierung eines Tiermodells für die Infektion weiblicher BALB/c-Mäuse mit drei swFLUAV-Isolaten ermöglichte antivirale Untersuchungen mit Oseltamivir *in vivo*. Das in den zellkulturbasierten Testen NAI-unempfindliche porcine H1N2-Isolat A/swine/Bakum/1832/00 mit sieben potentiellen HA-Glykosylierungsstellen, u. a. an den Positionen Asn158, Asn163 und Asn271, erwies sich im murinen Modell ebenfalls als relativ Oseltamivir-unempfindlich. Im natürlichen Wirt – dem Schwein – hingegen war die Infektion mit Oseltamivir therapierbar.

Am Beispiel der A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-Isolate „Berlin“ und „Dessau“ zeigte sich, dass die Historie der Viruserstisolierung und Passagierung in Zellkulturen mit unterschiedlicher Expression $\alpha 2,3$ - bzw. $\alpha 2,6$ -verknüpfter Sialinsäurerezeptoren die NAI-Empfindlichkeit beeinflussen kann. Bedingt durch Substitutionen im HA an den Aminosäuren 138 und 225 entstanden NAI-sensitive bzw. -resistente Virusvarianten. A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“ mit A/S138 und E/G225 konnte durch die NAI *in vitro* gehemmt werden, während A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ mit A138 und E225 in den zellkulturbasierten Testen in MDCK- und NHBE-Zellen resistent war. Die unterschiedliche Empfindlichkeit dieser Varianten bestätigte sich *in vivo* in der Maus.

Die im Ergebnis der vorliegenden Dissertation etablierten *In vitro*- und *In vivo*-Modelle können für antivirale Untersuchungen mit neuen potentiellen Virustatika gegen swFLUAV eingesetzt werden.

Summary

The emergence of A/H1N1v pandemic influenza A viruses (FLUAV) in spring 2009 demonstrated the potential of new virus variants that result from reassortment of gene segments of human, avian, and porcine origins. Recent pandemic isolates carry the neuraminidase (NA) as well as the M protein of Eurasian swine viruses. These proteins are relevant in terms of Flu therapy, because they represent targets of the currently approved drugs, adamantanamines and neuraminidase inhibitors (NAI). Although pigs are discussed as mixing vessel of avian, human, and porcine viruses only few is known about the susceptibility of swine FLUAV (swFLUAV) against existing drugs.

Here, the susceptibility of 31 human FLUAV (huFLUAV) and 74 swFLUAV of subtypes H1N1 and H1N2 (isolated between 1981 and 2006 in Germany) against the M2 ion channel inhibitor amantadine and the NAI oseltamivir and zanamivir was analyzed. All huFLUAV were amantadine sensitive, in the geno- as well as the phenotype. In contrast, the M2 protein of swFLUAV isolated since 1989 carried the S31N substitution known to confer resistance. Resistance was proved for selected viruses in plaque reduction assays in MDCK cells. Results from phylogenetic analysis indicated that resistant M2 genes of swFLUAV were not transferred to huFLUAV until the emergence of A/H1N1v pandemic viruses.

Susceptibility of the NA surface protein against both NAI was directly analyzed in enzyme inhibition assays, where all FLUAV were shown to be sensitive. Differences between the results of enzyme inhibition and cell culture-based plaque reduction and virus yield reduction assays done with selected FLUAV were detected for A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-"Berlin" and the H1N2-strains A/swine/Bakum/1832/00 and A/swine/Bakum/1833/00. Additionally, NAI did not inhibit the virus spread of these isolates in MDCK cells, studied by immunohistochemical detection of viral nucleoprotein. Neither oseltamivir nor zanamivir prevent infection of adjacent cells by these viruses.

Intranasal inoculation of female BALB/c mice with two selected huFLUAV was almost sub clinical. In contrast, infection with swFLUAV resulted in body weight loss, clinical symptoms, high virus titers in lungs and trachea as well as histological changes in the lungs of infected animals. Pathogenicity of FLUAV in mice was affected by their receptor binding specificity as well as potential N-glycosylation sites in the hemagglutinin (HA). Overexpression of α 2,3-linked sialic acid receptors in the murine upper and lower respiratory tract enabled efficient propagation of isolates with avian-like HA. Infections with more glycosylated isolates resulted in minor morbidity despite using a 10 times higher virus inoculation dose. These viruses were non lethal and body weight loss, lung consolidation as well as clinical symptoms were less pronounced.

The established animal model for infection of female BALB/c mice with swFLUAV enabled antiviral studies with oseltamivir in vivo. In cell culture-based assays NAI-resistant swH1N2-isolate A/swine/Bakum/1832/00 with seven potential HA N-glycosylation sites, amongst others in Asn158, Asn163, and Asn271, was also partly resistant in mice. In contrast, virus infection could be treated with oseltamivir in the natural host – the swine.

Moreover, virus isolation and propagation in cells with different levels of α 2,3- and α 2,6-linked sialic acids affected NAI susceptibility. This was shown using A/swine/Belzig/2/01 (H1N1) isolates “Berlin” and “Dessau”. Substitutions in HA amino acids 138 and 225 lead to NAI-sensitive and -resistant virus variants. A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-“Dessau” with A/S138 and E/G225 was NAI-susceptible in vitro, whereas A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-“Berlin” with A138 and E225 was NAI-resistant in cell culture-based assays with MDCK and NHBE cells. Different NAI susceptibilities were confirmed in mice.

The in vitro and in vivo models established in the result of these studies can be used for antiviral analysis of new potential drugs against swFLUAV.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Influenzaviren

Die Influenza-A-Viren (FLUAV) gehören zusammen mit den Influenza-B- und -C-Viren sowie den beiden Genera Thogoto- und Isavirus zur Familie der *Orthomyxoviridae*, welche durch ein segmentiertes Einzelstrang-RNA-Genom in Negativ-Orientierung charakterisiert ist.¹ Für alle fünf Genera sind die Wirte Vertebraten. Während Influenza-B- und C-Viren in der Regel nur beim Menschen vorkommen, findet man FLUAV auch bei einer Reihe anderer Säugetiere und bei Vögeln. Die durch Zecken übertragenen Thogotoviren sind bei verschiedenen Wirbeltieren und beim Menschen nachgewiesen worden.² Isaviren infizieren Lachse.³

Das segmentierte Virusgenom enthält die genetische Information für sieben bis zwölf verschiedene Proteine. Dabei liegen die einzelnen RNA-Segmente im Viruspartikel in Ringform vor. Während Influenza-A- und B-Viren acht Genomsegmente besitzen, die für elf Proteine kodieren, sind es bei den Influenza-C-Viren sieben RNA-Segmente für neun Proteine. Die sieben Proteine der Thogotoviren werden von sechs Genomsegmenten kodiert, bei den Isaviren sind es acht Segmente mit zehn Proteinen.⁴

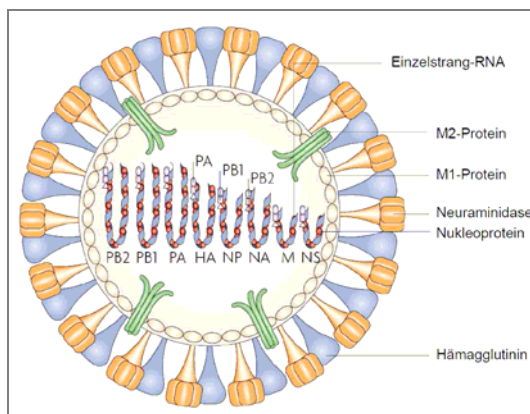


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Influenza-A-Virus (nach einer Publikation von Nelson und Holmes⁵).

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Dissertation liegt auf der antiviralen Therapie von FLUAV, auf deren Aufbau nachfolgend näher eingegangen werden soll. Die sehr komplexen Virionen (Abbildung 1) enthalten durchschnittlich 1 % RNA, 5 – 8 % Kohlenhydrate, 20 % Lipide, und ~ 70 % Proteine.⁴ Die Viruspartikel sind pleomorph, meist sphärisch und haben einen Durchmesser von ~ 100 nm. Aber auch filamentöse Partikel mit einer Länge > 300 nm wurden beobachtet.

Umgeben werden die Viren von einer Lipiddoppelmembran, welche bei der Bildung der Virionen von der Wirtszelle abgeschnürt wird. In der Membran sind die Oberflächenglykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) im Verhältnis 4 : 1 mit ihren hydrophoben Enden verankert. Diese bilden 10 – 14 nm lange Spikes mit einem Durchmesser von 4 – 6 nm.⁶ Durchspannt wird die Membran vom M2-

Ionenkanalprotein, an ihrer Innenseite ist sie vom Matrixprotein M1 ausgekleidet. Das RNA-Genom bildet zusammen mit dem Nukleoprotein (NP) und den Polymeraseproteinen PB1, PB2 und PA im Inneren der Viruspartikel das helikale Nukleokapsid (Ribonukleoprotein, RNP). Für die Infektionsfähigkeit werden alle acht Segmente benötigt, welche für die zwölf Genprodukte kodieren, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind. Die Genomsegmente besitzen hochkonservierte Enden mit einer Länge von zwölf Nukleotiden an ihrem 3'- bzw. 13 Nukleotiden am 5'-Ende. Durch die Interaktion der teilweise komplementären Enden kann die virale RNA (vRNA) in den Virionen und in infizierten Zellen eine zirkuläre, pfannenstielähnliche Form einnehmen.⁷

Tabelle 1: Genomstruktur von Influenzavirus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1).^{4, 8} Zusammengefasst sind die einzelnen Genomsegmente mit ihrer Länge auf Nukleinsäure- (NS) und Aminosäureebene (AS), dem kodierten Polypeptid und dessen Funktion.

Segment	NS	AS	Polypeptid	Funktion
1	2.341	759	PB2	Cap-Bindung
2	2.341	757	PB1	RNA-abhängige RNA-Polymerase
		718	PB1-N40	Regulation der RNA-Polymeraseaktivität von PB1
		78	PB1-F2	Virulenzfaktor, Apoptoseinduktion
3	2.233	716	PA	Serinproteaseaktivität
4	1.778	550	HA	Rezeptorbindung, Fusion, Hauptantigen
5	1.565	489	NP	RNA-Bindung, RNA-Synthese, Kern-transportsignal
6	1.413	454	NA	Abspaltung endständiger Neuraminsäurereste bei der Virusfreisetzung
7	1.027	252	M1	Interaktion mit vRNA und Oberflächenproteinen, Kernexport, Budding
		97	M2	Ionenkanal: <i>Uncoating</i> und <i>Assembly</i>
8	890	230	NS1	Hemmfaktor beim RNA-Spleißen
		121	NEP/NS2	Kernexportprotein

Die Replikation der FLUAV wird durch die Bindung der Viruspartikel an zelluläre Rezeptoren mithilfe des HA eingeleitet. Bei den Rezeptoren handelt es sich um Sialinsäuren (N-Acetylneuraminsäuren, NeuAc), die über $\alpha 2,3$ - bzw. $\alpha 2,6$ -Bindungen mit Galaktose (NeuAc $\alpha 2,3$ Gal oder NeuAc $\alpha 2,6$ Gal) verknüpft sind.⁹ Nach der rezeptorvermittelten Endozytose induziert das HA die Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran.¹⁰ Durch den niedrigen pH-Wert in den Endosomenvesikeln erfährt

das HA einen Konformationswechsel, wodurch der freie hydrophobe N-Terminus der HA2-Untereinheit in die Vesikelmembran inseriert und deren Fusion mit der Virusmembran initiiert wird. Es kommt zur Freisetzung der Bestandteile des Virions in das Zytoplasma der infizierten Zelle. Dabei wird die Interaktion der RNP mit den M1-Proteinen durch die Ansäuerung der Virionen mithilfe der H^+ -Protonenpumpe des M2-Proteins gelöst.^{11, 12} Das Vorhandensein von freien RNP im Zytoplasma schließt das *Uncoating* ab. Die segmentierten Nukleokapside werden durch die Kernporen in den Zellkern transportiert, wo die folgenden Transkriptions- und Replikationsschritte ablaufen.¹² Das als *Reverse Transkription* bezeichnete Umschreiben der vRNA in virale Boten-RNA (*messenger* RNA, mRNA) während des Replikationszyklus wird allein durch die Virusproteine gesteuert. Die mit den viralen Nukleokapsiden assoziierten Polymerasekomplexe beginnen mit der Transkription der mRNA. Der Promotor für die Synthese liegt im nichtkodierenden Bereich am 3'-Ende der vRNA, die den Transkriptionsstartpunkten vorgelagert sind. Die Primärtranskripte werden in die Proteine der frühen Phase der Infektion – NP und NS1 – translatiert, welche anschließend in den Nukleus einwandern. Es wird vermutet, dass die erhöhte Konzentration an freiem NP den Shift von der mRNA-Synthese zur Synthese komplementärer (cRNA) und viraler RNA (vRNA) reguliert, wobei die cRNA als Matrize für neue vRNA-Stränge dient. Diese werden im Nukleus in NPs eingebettet und dienen als Template für die sekundäre Transkription viraler mRNA. Die Haupttranslationsprodukte in den späteren Phasen der Infektion sind die M1-, HA- und NA-Proteine. Die Proteine der Virushülle werden am rauen Endoplasmatischen Retikulum translatiert und anschließend mithilfe des zellulären Exozytoseapparates des Wirts zur Zelloberfläche transportiert und in die Zellmembran integriert. Während dieses Transportes werden die Proteine durch Glykosylierung, Acetylierung und im Falle des HA durch proteolytische Spaltung in die Untereinheiten HA1 und HA2 modifiziert.¹³

Durch einen Knospungsprozess (*Budding*) werden die neugebildeten Viruspartikel freigesetzt. Interaktionen zwischen dem M1-Protein und den zytoplasmatischen Domänen der Proteine HA, NA und M2 werden als Signal für diesen Vorgang angenommen.¹⁴ Durch die enzymatische Aktivität des NA-Proteins werden die Viren von der Wirtszelloberfläche abgespalten. Noch nicht ganz aufgeklärt ist der Mechanismus zur Komplettierung der acht RNA-Segmente in die einzelnen Virionen, aber neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass einzelne Verpackungssignale auf allen vRNA-Segmenten sicherstellen, dass ein komplettes Genom in den Großteil der Viruspartikel integriert wird.¹⁵

Für effiziente Influenzavirusinfektionen ist eine optimale Balance der HA- und NA-Oberflächenglykoproteine notwendig.¹⁶ Während das HA an sialinsäurehaltige Rezeptoren auf den Zielzellen bindet um die Virusinfektion einzuleiten, spaltet die NA

Sialinsäuren von zellulären Rezeptoren und extrazellulären Inhibitoren um die Virusfreisetzung und somit deren Ausbreitung zu ermöglichen.

Für die antivirale Therapie von FLUAV dienen die beiden Oberflächenglykoproteine HA und NA sowie das integrale Membranprotein M2 als Target. Daher wird nachfolgend die Struktur dieser Proteine näher erläutert.

Das Hämagglutinin stellt das Hauptoberflächenprotein dar. Seine Struktur und Funktionen sind intensiv untersucht wurden.^{13, 17} Als integrales Membranprotein vom Typ I ist das Homotrimer über seinen C-Terminus in die Virusmembran inseriert. Es spielt zum einen eine wichtige Rolle in der Rezeptorbindung und Fusion der Viruspartikel mit der Wirtszellmembran und zum anderen beim *Budding* und der Viruszusammensetzung. Im Reifeprozess werden neusynthetisierte HA-Moleküle posttranslational durch Abspaltung des Signalpeptids und der Spaltung an Aminosäure (AS) 329 in die beiden Untereinheiten HA1 und HA2, welche über Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden bleiben, modifiziert. Die Rezeptorbindetasche am globulären Kopf des Moleküls vermittelt die Interaktion des Proteins mit den zellulären Rezeptoren.¹³ Die Rezeptorbindestellen bestehen aus den hochkonservierten AS Tyr98, His183, Glu190, Trp153 und Leu194. Zur Stabilisierung der Rezeptorbindetasche dienen Cys97, Pro99, Cys139, Pro147, Tyr195 und Arg229, welche keine direkte Interaktion mit dem Rezeptor eingehen. Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Rezeptor bilden die AS Tyr98, Ser136, His183 und Glu190 über ihre polaren Seitenketten. Zusätzlich gehen Trp153, Leu194 und Leu226 van der Waal-Bindungen mit hydrophoben Komponenten des Rezeptors ein. Potentiell können auch die AS 225 – 228 rechts und 131 – 137 links der Rezeptorbindestelle mit den Rezeptoren interagieren.

Die Neuraminidase ist als integrales Membranprotein vom Typ II, welches mit seinem N-Terminus in der Zellmembran verankert ist, nicht gleichmäßig über die gesamte Virusoberfläche verteilt, sondern bildet sogenannte Kappen. Die Tetramere haben eine katalytische Funktion und spalten die terminalen Sialinsäuren von Glykoproteinen oder Glykolipiden, ein Prozess der essentiell für die Freisetzung neugebildeter Viruspartikel und somit für die Virusverbreitung ist. Die Struktur der Proteine wurde Mitte der 1980er Jahre aufgeklärt. Die NA-Moleküle bestehen aus einem globulärem Kopf mit dem katalytischen Zentrum, einer Stielregion und der Membranverankerungsdomäne. Das aktive Zentrum des Enzyms setzt sich aus neun katalytischen AS (Arg118, Asp151, Arg152, Asp198, Arg224, Glu276, Arg292, Arg371 und Tyr406) mit direktem Kontakt zum Substrat und elf sogenannten *framework* AS (Glu119, Arg156, Trp178, Ser179, Asp198, Ile222, Glu227, Glu277, Asn294 und Glu425) mit Stabilisationsfunktion zusammen.¹⁸ All diese AS sind (mit Ausnahme von Asn198 in N7 und N9) hochkonserviert innerhalb der

NA-Subtypen. Basierend auf den 3D-Strukturen ihres aktiven Zentrums können diese Subtypen in zwei Gruppen eingeteilt werden.¹⁹ Während bei der N1-Gruppe (N1, N4, N5, N8) eine kleine Spalte in unmittelbarer Nähe zur Ligandbindungsstelle gebildet wird, fehlt diese bei den Subtypen die der N2-Gruppe (N2, N3, N6, N7, N9) zugeordnet werden.

Das M2-Protein entsteht durch Spleißen des kolinearen Transkriptes von Genomsegment 7. Als integrales Membranprotein vom Typ III besteht es aus einer kurzen N-terminalen Ektodomäne (23 AS), einer 20 AS langen Transmembrandomäne und dem 53 AS umfassenden C-terminalen zytoplasmatischen Schwanz.²⁰ Mit seiner Protonenpumpenaktivität ist das M2-Protein essentiell für die virale Replikation. Es ist früh während der Infektion durch die Ansäuerung des Virions bei der Freisetzung der viralen Nukleinsäure, aber auch während der Morphogenese aktiv.

2.2 Epidemiologie der Influenza-A-Viren

Bis heute sind 16 HA-²¹ und neun NA-Subtypen²² bekannt, welche die Virussubtypen bestimmen und in ihrer gesamten Vielfalt nur bei Vögeln nachgewiesen wurden. Beim Menschen zirkulieren bislang nur Viren der Subtypen H1 – 3 sowie N1 – 2.²³ Diese sind in der humanen Bevölkerung endemisch und werden durch direkte Mensch-zu-Mensch-Übertragung während akuter Infektionen verbreitet. Dabei liegt die Influenzasaison in der nördlichen Hemisphäre in den Monaten Dezember bis Mai, während sie in der südlichen Hemisphäre von Mai bis September ihren Höhepunkt hat. Aus subtropischen Regionen und nahe des Äquators sind ganzjährige Influenzaerkrankungen bekannt.²⁴

Die hohe genetische Variabilität der Influenzaviren und das Übertreten von Speziesschranken sind von grundlegender Bedeutung für die Epidemiologie der Grippe.²⁵ Zum einen können sich die Antigenbindungsbereiche der beiden Oberflächenproteine HA und NA derart verändern, dass die Viren nicht mehr von den zirkulierenden Wirtsantikörpern neutralisiert werden können. Ursache für diesen als *Antigen Drift* bezeichneten Mechanismus sind Punktmutationen, welche durch die Fehlerrate der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase ($1,5 \times 10^{-5}$ Mutationen/Nukleotid)²⁶ während der Replikation hervorgerufen werden und in AS-Austauschen, Insertionen und Deletionen resultieren können.

Der *Antigen Shift* bietet eine weitere Möglichkeit zur Veränderung der Influenzaviren. Die Wirtsbarriere stellt kein unüberwindbares Hindernis für das Virus dar. So ist eine Koinfektion mit Viren unterschiedlichen Ursprungs möglich, was eine Reassortierung der Genome zur Folge haben kann. Dadurch oder mittels direkter Übertragung aviärer oder porziner Viren auf den Menschen können Viren mit völlig neuen HA- und NA-

Oberflächenproteinen in der praktisch ungeschützten Bevölkerung auftreten und sich ungehemmt ausbreiten. Es kommt zum relativ seltenen Ereignis einer Pandemie.

Von einer Epidemie (Grippewelle) spricht man, wenn etwa im Abstand von 2 – 4 Jahren 10 – 20 % der Bevölkerung infiziert sind und die Ausbrüche lokal begrenzt bleiben. Pandemien mit globaler Ausbreitung und Infektionen in 20 – 40 % der Weltbevölkerung treten nur in größeren Abständen (10 – 40 Jahre) auf. Für beide Ereignisse ist eine erhöhte Mortalität bei Kleinkindern und älteren Menschen sowie bei immunsupprimierten Patienten charakteristisch.²⁴

Im 20. Jahrhundert traten drei große Influenzapandemien auf.²⁷ Bei der „Spanischen Grippe“ 1918/19 kam es zu einer direkten Übertragung aviärer FLUAV auf den Menschen.²⁸ Nach Adaptation an den humanen Rezeptor konnte sich dieses Virus effizient replizieren.²⁹ Es kam zu einer weltweiten Ausbreitung, die 50 – 100 Millionen Tote forderte. Im Vergleich zu anderen Pandemien, bei denen ein U-förmiger Verlauf mit hohen Sterberaten bei Kleinkindern und Patienten über 65 Jahren zu verzeichnen war, trat bei der „Spanischen Grippe“ bedingt durch einem W-förmigen Verlauf zusätzlich eine erhöhte Mortalität in der Altersgruppe der 20 – 40-Jährigen auf.²⁸

Durch Reassortierung von aviären H2N2- mit den humanen H1N1-Viren von 1918 entstand 1957 die „Asiatische Grippe“ (H2N2). Bei diesem Erreger waren die Oberflächenproteine HA und NA³⁰ sowie das PB1-Protein³¹ aviären Ursprungs.

1968 führte ein weiteres Reassortierungsereignis zur „Hong Kong Grippe“ (H3N2). Von aviären H3-Viren der eurasischen Linie wurden die HA-³⁰ und PB1-Segmente³¹ in die zirkulierenden H2N2-Viren eingeführt.

Zum Wiedereintrag von H1N1-Viren in die humane Bevölkerung kam es 1977 durch Impfwischenfälle mit H1N1-Lebendvakzinen.²² Diese sogenannte „Russische Grippe“ hatte vor allem bei Kindern pandemischen Charakter. Seitdem kozirkulieren Viren der Subtypen H1N1 und H3N2 in der humanen Bevölkerung.

Durch ein erneutes Reassortierungsereignis zwischen den H1N1- und H3N2-Viren entstanden zwischen 1999 und 2001 humane Influenzaviren des Subtyps H1N2.³² Bei diesen Viren wurde allein das HA-Gen ausgetauscht, die NA und die inneren Gene sind identisch mit den H3N2-FLUAV.

Wildvögel der Ordnungen *Anseriformes* (Enten, Gänse, Schwäne) und *Charadriiformes* (Möwen, Schwalben, Strandläufer) bilden das natürliche Reservoir aller FLUAV.²² Die Tiere scheiden hohe Viruskonzentrationen über ihre Fäkalien aus,^{33, 34} welche in Flussgewässern nachgewiesen werden können.³⁵ Kontaminiertes Wasser und Fäkalien stellen auch die Hauptübertragungswege zwischen den Wildvögeln dar. In Enten erfolgt

die Virusreplikation in den Epithelzellen des Intestinal- und Respirationstraktes.³³ Während die Infektion in diesen Spezies asymptomatisch verläuft, entwickeln infizierte Truthähne respiratorische Symptome. In infizierten Hühnchen kann es zu Mortalitätsraten von bis zu 100 % kommen. Entsprechend ihrer Pathogenität für Hühnchen werden aviäre FLUAV in hoch- (HPAIV) und niedrigpathogene (LPAIV) Viren eingeteilt. LPAIV verursachen milde respiratorische Symptome, während HPAIV innerhalb kurzer Zeiten zu letalen Krankheitsverläufen führen.³⁶ HPAIV sind durch polybasische HA-Spaltstellen gekennzeichnet und entstehen durch Mutationen aus LPAIV.³⁷ Alle bekannten HPAIV gehören zum Subtyp H5 oder H7. Seit den 1950ern kam es weltweit zu 24 Ausbrüchen HPAIV in Nutzgeflügelbeständen.³⁷ So führten z. B. H7N7-Infektionen in Deutschland 1979 zum Tode von 600.000 Hühnchen und 80 Gänsen. Durch H7N1-Übertragungen auf das Hausgeflügel verendeten 1999 in Italien rund 14 Millionen Tiere. Den Höhepunkt in Europa erreichte die Geflügelpest 2003 mit dem Ausbruch von H7N7-Infektionen in 255 Nutzgeflügelbeständen in den Niederlanden mit 30 Millionen toten Vögeln. All diese Infektionen führten zwar zu hohen Tierverlusten, Übertragungen auf den Menschen wurden jedoch nur in Einzelfällen beobachtet. 1997 kam es in Hong Kong erstmals zu Erkrankungen mit einem aviären FLUAV vom Subtyp H5N1, bei denen sechs von 18 infizierten Menschen starben. Seither sind mehrere solcher unabhängigen Transmissionen aviärer Influenzaviren auf den Menschen aufgetreten. In den Niederlanden wurden 2003 mindestens 82 Personen mit aviären H7N7-Viren infiziert. Auch bei der Übertragung des Subtyps H9N2 auf zwei Kinder 1999 in Hong Kong war das Hausgeflügel der Zwischenwirt. In all diesen Fällen konnten keine Mensch-zu-Mensch-Infektionen nachgewiesen werden.

Besonders die weltweite Ausbreitung an H5N1-Infektionen seit April 2005 und deren Übertragbarkeit auf den Menschen stellen ein ernstzunehmendes Problem dar.³⁸ Bis zum 19.11.2010 gab es weltweit 508 Menschen mit H5N1-Infektionen resultierend in 302 Todesfällen.³⁹

Eine wichtige Barriere für das Wirtsspektrum und die Pathogenese der FLUAV stellt ihre Präferenz für bestimmte Sialinsäurereste dar. Basierend auf Unterschieden in der HA-Struktur adsorbieren aviäre FLUAV an α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren, die im Intestinaltrakt der Wildvögel vorherrschend sind, während die humanen Erreger an Rezeptoren binden, die über α 2,6-Bindungen mit Galaktose verknüpft sind.⁴⁰ Lange Zeit ging man davon aus, dass im humanen Bronchialepitheltrakt ausschließlich α 2,6-verknüpfte Sialinsäurereste lokalisiert sind, die nur die spezifische Bindung und effiziente Replikation humaner Viren ermöglichen und eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung aviärer FLUAV unterbinden. Neuere *In vitro*-Untersuchungen an differenzierten humanen Bronchial-

Trachealepithelzellen zeigten jedoch, dass aviäre und humane FLUAV (huFLUAV) unterschiedliche Zelltypen des humanen Atemwegsepithels infizieren können.⁴¹ So werden zilienlose Epithelzellen hauptsächlich von humanen Erregern infiziert, da sie $\alpha 2,6$ -verknüpfte Sialinsäurereste exprimieren, während aviäre Viren an die in der Unterzahl vorhandenen zilienhaltigen Zellen über $\alpha 2,3$ -verknüpfte Sialinsäurereste binden können. Weitere Analysen des humanen Respirationsgewebes konnten Aufschluss über die genauere Verteilung der beiden Rezeptortypen im humanen Atemwegstrakt geben. $\alpha 2,6$ -verknüpfte Sialinsäurereste sind vor allem auf den Epithelzellen des oberen Respirationstrakts (Nasenschleimhaut, Nasennebenhöhlen, Rachen, Trachea, Bronchien) und $\alpha 2,3$ -verknüpfte Sialinsäurereste im unteren Respirationstrakt (Alveolen) lokalisiert.⁴² Der Nachweis beider Rezeptortypen im humanen Respirationstrakt erklärt somit die Möglichkeit einer Transmission aviärer Viren auf den Menschen. Dennoch ist eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung per Tröpfcheninfektion wegen der eingeschränkten Replikationsfähigkeit dieser Erreger im oberen Respirationstrakt limitiert. Nur die Bindung an den humanen Rezeptor ermöglicht eine effiziente zwischenmenschliche Virusausbreitung. Es besteht die Möglichkeit, dass eine Anpassung von Vogelinfluenzaviren an den humanen Rezeptor über einen Zwischenwirt erfolgen kann und dadurch neue Viren mit pandemischem Potential entstehen können.

Dem Schwein kommt dabei eine besondere Rolle zu. Zum einen können diese Tiere sowohl auf natürlichem Wege als auch experimentell mit aviären FLUAV infiziert werden.⁴³ Zum anderen werden auf den porzinen Atemwegsepithelien beide Klassen von Rezeptoren exprimiert.⁴⁴ Dadurch können die Tiere von Viren menschlichem und aviärem Ursprungs infiziert werden,⁴³ zumal beide Virustypen die Kapazität zur Replikation im Schwein besitzen.⁴⁵ Eine kontinuierliche Replikation aviärer Viren in dem porzinen Zwischenwirt kann zur Entstehung aviärer Virusvarianten führen, die bevorzugt an humane Rezeptoren binden und somit auch effizient den oberen Respirationstrakt des Menschen infizieren können, was die Gefahr einer direkten Mensch-zu-Mensch-Übertragung dieser Viren erhöht.⁴⁴ Weiterhin besteht im Schwein die Möglichkeit, dass es zu Doppel- oder Mehrfachinfektionen einzelner Zellen mit FLUAV unterschiedlicher Ursprünge (porzin, aviär, human) kommt. Durch Reassortierung der Genomsegmente können neuartige Virusvarianten entstehen, bei denen die HA- oder NA-Segmente mit den übrigen Segmenten neu kombiniert sind. Das Schwein wird aus diesem Grund als *mixing vessel* bezeichnet.

Weltweit kozirkulieren derzeit Viren der Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2 in den Schweinepopulationen.⁴⁶ Dabei unterscheiden sich die europäischen und asiatischen Linien deutlich von den nordamerikanischen Isolaten.⁴⁷

Erstmals wurden porzine FLUAV vom Subtyp H1N1 1930 in US-amerikanischen Schweinen nachgewiesen.⁴⁸ Diese Isolate hatten den gleichen aviären Ursprung wie das humane Pandemievirus von 1918/19 und wurden in der amerikanischen Schweinepopulation endemisch (*classical swine H1N1*). Einen Überblick über die Evolution der Schweine-Influenza-A-Viren (swFLUAV) in Europa gibt ein Review von Kuntz-Simon und Madec aus dem Jahr 2009.⁴⁶ Wahrscheinlich durch einen Schweineimport aus Nordamerika wurden die Viren der *classical swine H1N1*-Linie nach Europa verschleppt, wo sie erstmals 1976 in Italien nachgewiesen werden konnten. Durch eine Übertragung aviärer FLUAV aus Wildenten in die europäische Schweinepopulation wurde die *classical swine H1N1*-Linie verdrängt, es entstand die europäische *avian-like swine H1N1*-Linie. Mehrere unabhängige Übertragungen humaner H3N2-Viren auf das Schwein wurden beobachtet. 1984 entstanden daraus durch eine Reassortierung mit der *avian-like swine H1N1*-Linie die europäischen *reassortant human-like H3N2*-Viren. In dieser Linie sind die beiden Oberflächenproteine HA und NA *human-like*, während die inneren Gene aviärem Ursprungs sind. Durch ein weiteres Reassortierungsereignis zwischen *human-like H1N1*-Viren, die seit der Epidemie 1977 in den europäischen Schweinen nachgewiesen wurden und den *reassortant human-like H3N2*-Viren kam es 1994 zum Auftreten porziner Viren des Subtyps H1N2 (*reassortant human-like swine H1N2*). Diese swFLUAV erhielten ein neues *human-like* HA-Protein, die NA und die inneren Gene stammen von den porzinen H3N2-Viren. Der neue Subtyp konnte sich sehr schnell in Europa ausbreiten und ist seitdem endemisch, auch in der deutschen Schweinepopulation.⁴⁹⁻⁵¹ Während die Evolutionsrate in porzinen H3N2-Viren allgemein deutlich niedriger liegt als in humanen Viren des gleichen Subtyps,⁵² konnten in porzinen H1N2-Stämmen unter anderem in Deutschland weitere Reassortierungsereignisse nachgewiesen werden.^{53, 54}

Wie eine Zusammenstellung von Myers *et al.* zeigt, ist die Übertragung der swFLUAV auf den Menschen selten.⁵⁵ Bis zum Ausbruch der A/H1N1v-Pandemie waren weltweit nur 50 sporadische Fälle, u. a. aus der Schweiz, Spanien und den Niederlanden,⁵⁶⁻⁶⁰ bekannt. Auch in Hong Kong konnten bei einem infiziertem Kind FLUAV des Subtyps H3N2 nachgewiesen werden, die nahverwandte mit den europäischen Schweineviren sind.⁶¹ Da die Infektionen häufig mild oder symptomfrei verlaufen, mag die Dunkelrate jedoch weitaus höher liegen. Ein besonderes Risiko der Infektion tragen Personen mit erhöhter Exposition zu Schweinen wie z. B. Züchter, Tierärzte und Schlachter.^{62, 63} Krumbholz *et al.* konnten bei diesen Personen in ~ 15 % der untersuchten Proben Antikörper gegen swFLUAV nachweisen.⁶²

In den USA zirkuliert seit 1998 eine Triple-Reassortante bestehend aus fünf Genen der *classical swine H1N1*-Linie, einem humanen PB1 und dem PB2 sowie PA-Protein aviärem Ursprungs, welche in elf Fällen auf den Menschen übertragen wurde.⁶⁴ Seit dem Frühjahr 2009 ist mit dem Auftreten humaner Infektionen mit einem bisher unbekannten porzinem Virus des Subtyps H1N1, dass sich auch von Mensch-zu-Mensch übertragen kann, die erste Pandemie des 21. Jahrhunderts entstanden.⁶⁵ Innerhalb von drei Monaten breitete sich das Virus weltweit aus. Bis zum 06.08.2010 wurden in > 214 Ländern Infektionen mit mindestens 18.449 Todesfällen registriert,⁶⁶ darunter mindestens 226.158 Infektionen und 255 Todesfälle in Deutschland (Stand 18.05.2010).⁶⁷ Diese neuen Virusvarianten (A/H1N1v) sind durch Reassortierung der Triple-Reassortante mit den NA- und M-Genen eurasischer swFLUAV und dem HA porziner H1N2-Viren entstanden.⁶⁸⁻⁷¹

2.3 Klinik, Pathogenese und Diagnostik der Grippe

Die durch virushaltige Aerosole (Tröpfcheninfektion) sowie über Kontakt- oder Schmierinfektionen übertragenen Influenzaviren verursachen beim Menschen die sogenannte „echte“ Grippe, eine schwere Erkrankung der Atemwege und des gesamten Organismus. Auch asymptomatische Verläufe sind möglich. Humane FLUAV binden über ihre HA-Oberflächenmoleküle an α 2,6-verknüpfte Sialinsäurereste auf den Epithelzellen der Schleimhäute des Nasopharynx.⁷² Die NA spaltet von den im Bronchialschleim enthaltenen Mukoproteinen Zuckerseitenketten ab, wodurch die Virusausbreitung im Bronchialraum erleichtert wird.⁷³ Nach 1 – 2 Tagen kommt es zur Freisetzung neugebildeter Viruspartikel, wobei 2 – 3 Tage nach dem Auftreten der ersten grippalen Symptome die Virusvermehrung ihren Höhepunkt erreicht. Besonders typisch für eine Influenzaerkrankung ist der plötzliche Beginn mit hohem Fieber, Schüttelfrost, starkem Krankheitsgefühl, Kopf- und Gliederschmerzen, Rhinitis, Pharyngitis, ausgeprägter Photophobie und Kreislaufbeschwerden. Die akute Infektion ist in ca. 4 – 8 Tagen abgeklungen, doch es besteht eine lange Rekonvaleszenz.⁷⁴ Bei Kindern verläuft die Infektion ähnlich, allerdings stehen hier hohes Fieber mit Krampfneigung, Krupp, Otitis media⁷⁵ und Myositis⁷⁶ im Vordergrund.

Zu Komplikationen kann es vor allem bei älteren Personen (> 65 Jahre), Menschen mit schwerwiegenden Grunderkrankungen wie chronischen Herz-Lungen-Erkrankungen, Stoffwechselerkrankungen, Immundefekten sowie bei ungeimpften Kindern und jüngeren Erwachsenen in Form einer Bronchitis, Bronchopneumonie oder Pneumonie kommen. Lungenentzündungen können auch sekundär durch bakterielle Superinfektionen entstehen. Bakterielle Erreger sind hierbei vor allem *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae*.^{77, 78} Die enzymatischen Produkte

dieser Bakterien, insbesondere die Proteasen von *Staphylococcus aureus*, begünstigen die Virusausbreitung durch Spaltung des HA-Vorläufers in die Untereinheiten HA1 und HA2. Weiterhin können Komplikationen außerhalb des Respirationstraktes durch eine bakterielle Superinfektion hervorgerufen werden (Myositis, Myokarditiden). In seltenen Fällen treten Meningitiden und Enzephalitiden auf. Ein letaler Ausgang der Infektion ist in den Risikogruppen am häufigsten.

Die saisonale („interpandemische“) Influenza gehört zu den Infektionskrankheiten mit den höchsten bevölkerungsbezogenen Sterblichkeiten. So erkrankten jährlich etwa 5 – 15 % der Bevölkerung weltweit mit ca. 0,5 – 1 Millionen Todesfällen.⁷⁹ In Deutschland sind es 5.000 – 8.000 Tote jährlich.^{80, 81} In Epidemien sterben ca. 20.000 Deutsche, wie z. B. in den Saisons 2002/03 und 2004/05. Im Vergleich zur saisonalen Grippe führt die pandemische Influenza zu höheren Morbilitäts- und Mortalitätsraten mit z. B. ca. 40 Millionen erkrankten BRD-Bürgern infolge der „Hong Kong Grippe“ 1968.

Humane Erkrankungen mit aviären FLUAV verlaufen bei Infektionen mit H5N1-Viren schwerwiegend und wurden auch für H7- und H9-Subtypen beschrieben.⁷² Im Vergleich zu humanen FLAUV binden aviäre Isolate bevorzugt an α 2,3-verknüpfte Sialinsäurereste, die vor allem auf den Alveolar- und Bronchiolarepithelzellen sowie auf Bindehautzellen lokalisiert sind.^{42, 82} Während bei einer normalen Grippe mit einem humanen Erreger vor allem die Epithelien der respiratorischen Schleimhaut zerstört werden, resultieren Infektionen mit aviären FLUAV in diffusen Alveolarschäden.⁸³ Nach einer Inkubationszeit von gewöhnlich 2 – 5 Tagen werden frühe Krankheitssymptome wie hohes Fieber, Husten, Unwohlsein, Kopf- und Halsschmerzen, Übelkeit, Erbrechen und Durchfall beobachtet.⁸³ Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es bei allen Patienten zur Atemnot und Pneumonie. Auch Virämien und extrarespiratorische Komplikationen treten bei H5N1-Infektionen sehr viel häufiger auf. So kann es zu Magen-Darm-Beschwerden, Herzversagen, Konjunktividen, Enzephalitiden ebenso wie zum Multiorganversagen mit fatalem Ausgang kommen.

Humane Infektionen mit swFLUAV verlaufen normalerweise subklinisch, allerdings sind auch schwerwiegende Fälle mit fatalem Ausgang bekannt.⁵⁵ Infektionen mit dem H1N1-Pandemiestamm von 2009 führen nach einer Inkubationszeit von 1,5 – 3 Tagen zu einem breiten Spektrum an Symptomen von milden, fieberfreien Infektionen des oberen Respirationstrakts bis hin zu fulminanten viralen Pneumonien.⁸⁴ Die meisten Erkrankungen sind selbstlimitierend mit unkomplizierten fiebrigen respiratorischen Symptomen ähnlich der saisonalen Grippe. Häufig treten systemische Infektionen auf. Auch gastrointestinale Symptome einschließlich Übelkeit, Erbrechen und Durchfall kommen häufiger vor als bei der interpandemischen Influenza. Schwerere Verläufe und

Komplikationen werden u. a. durch Atemnot, Pseudokrupp bei Kindern, Brustschmerzen, blutige und eitrige Auswürfe sowie verlängertes oder rezidivierendes Fieber bedingt. Bei Kleinkindern führt die A/H1N1v-Infektion zu Reizbarkeit, Lethargie, Appetitlosigkeit, Dehydrierung und Krämpfen. Schwere Komplikationen bedingt durch bakterielle Koinfektionen, Enzephalopathie oder Enzephalitis und Ketoazidose werden in diesen Patienten beobachtet.

Bei einer Grippe bilden sich während des Infektionsverlaufs lokal und systemisch wirkende neutralisierende Antikörper der Immunglobulinklassen IgM, IgA und IgG gegen die HA-, NA-, NP- und M-Proteine.²³ Diese Antikörperreaktion induziert einen lebenslang anhaltenden Schutz vor Reinfektionen mit der gleichen Antigenvariante. Durch die hohe Antigenvariabilität der Influenzaviren bieten diese Antikörper jedoch keinen Schutz vor einer erneuten Influenzaerkrankung.

Die Eliminierung des Virus aus dem Organismus wird vor allem durch zytotoxische T-Zellen gewährleistet. Sie erkennen die Oligopeptide des NP-Proteins in Kombination mit MHC-Klasse-I-Proteinen. Durch eine Influenzavirusinfektion werden chemotaktische, proinflammatorische und antivirale Zytokine sezerniert.⁸⁵ Dabei stellen Interleukin-6 (IL-6) und Interferon- α (IFN- α) die Hauptfaktoren der Wirtsantwort dar.⁸⁶

Die Diagnose einer Influenzainfektion erfolgt zum einen über das klinische Bild der Erkrankung und zum anderen durch die Bestimmung von IgM-Antikörpern im Serum, der Virusisolierung aus Rachspülwasser bzw. bronchoalveolärer Lavage oder dem Nachweis von Virusproteinen in Biopsiematerial. Auch ein Influenza-Schnelltest steht zur Verfügung. Die Detektion viraler RNA aus Nasenspülwasser oder -abstrichen mittels RT-PCR stellt die beste und schnellste Methode zum Virusnachweis dar und wird von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) für die A/H1N1v-Pandemie empfohlen.⁸⁷

2.4 Grippeprophylaxe

Die Vakzinierung stellt derzeit die wirksamste Methode zur Bekämpfung der Influenza dar. Eine regelmäßige Impfung wird besonders bei Risikogruppen (Kleinkinder von 6 – 23 Monaten, Schulkinder im Alter von 5 – 18 Jahren, Menschen > 65 Jahre und Personen mit Herz-Kreislauf-Leiden) sowie beruflich exponierten Personen empfohlen,⁸⁸ ist aber für die gesamte Bevölkerung sinnvoll.⁸⁹ Ein Review von Kemble und Greenberg gibt eine Zusammenfassung über traditionelle und neue Ansätze zur Impfstoffentwicklung.⁹⁰

Für die Impfprophylaxe der saisonalen Grippe stehen vier verschiedene Vakzine zur Verfügung: inaktivierte Vollpartikel-, Spalt- und Subunit-Impfstoffe sowie attenuierte

Lebendimpfstoffe. In Deutschland sind nur Spalt- und Subunit-Impfstoffe zugelassen.⁹¹ Inaktivierte Influenzavakzine existieren seit Mitte der 40er Jahre des 20. Jahrhunderts. Sie werden in Hühnerembryonen angezüchtet, anschließend gereinigt und chemisch inaktiviert.⁸⁸ Bei den frühen inaktivierten Gesamtpfistoffen traten hohe Raten an Impfreaktionen auf, welche die Entwicklung von Spaltimpfstoffen notwendig machten. Diese Impfstoffe enthalten alle virusspezifischen Proteine. Demgegenüber bestehen die sogenannten Subunit-Impfstoffe aus den gereinigten Oberflächenantigenen HA und NA. Sie sind frei von RNA und Hüllproteinen. Die derzeit weltweit verwendeten inaktivierten Vakzine sind trivalent und enthalten je 15 µg der Influenza-A-Subtypen H1N1 und H3N2 sowie einen Influenza-B-Stamm.⁸⁸ Der erzielte Impfschutz beträgt 70 – 90 % in gesunden Erwachsenen. Er ist bei Personen > 65 Jahre geringer, allerdings kann hier in bis zu 80 % der Erkrankungsfälle der Influenza-bedingte Tod verhindert werden.

Das größte Problem bei der Immunisierung besteht in der jährlichen Auswahl der Virusstämme, aus denen die Impfstoffe hergestellt werden sollen. Der produzierte Impfstoff ist nur dann effektiv, wenn die HA- und NA-Glykoproteine der zur Herstellung verwendeten Virusstämme immunologisch nah mit dem zum gegebenen Zeitpunkt zirkulierenden Virusstamm verwandt sind. Die von der WHO durchgeführten Beobachtungen über die zirkulierenden Influenzaviren bilden die Grundlage für die jährlich im Frühjahr herausgegebenen Empfehlungen für die Antigenkombination der Influenza-Impfstoffe für die kommende Saison.⁹² Für die Saison 2010/11 empfiehlt die WHO die Kombination aus *A/California/7/2009(H1N1)-like*, *A/Perth/16/2009(H3N2)-like* und *B/Brisbane/60/2008-like* Viren.⁹³

Ein bedeutender Nachteil der konventionellen Impfstoffherstellung in Hühnerembryonen ist zum einen die Nichtanwendbarkeit bei bestehender Eiweißallergie. Des Weiteren ist die Technik sehr zeitaufwendig und anfällig für Verunreinigungen. Alternativen bieten verschiedene Ansätze zur Impfstoffherstellung in Zellkulturen, vor allem in MDCK- und Vero-Zellen.^{94, 95} Weitere Alternativen zu den konventionellen Impfstoffen bieten beispielsweise i) DNA-Vakzine, welche weder komplette Viren noch virale Proteine enthalten, ii) Virosomalvakzine, die aus rekonstruierten Virushüllen bestehen und iii) Impfstoffe mit Adjuvantien wie MF59® oder AS03.⁹⁶ Ein weiterer Ansatz besteht iv) in der Verwendung alternativer Antigene wie der externen Domäne des M2-Proteins oder dem Nukleoprotein.

Mit dem Auftreten der H1N1-Pandemie Anfang 2009 mussten innerhalb kürzester Zeit hohe Mengen an Impfstoffen produziert werden. Es wurden sowohl inaktivierte Ganzvirusvakzine, inaktivierte Spaltimpfstoffe, Subunit-Impfstoffe und lebend-attenuierte Vakzine entwickelt.⁹⁷ Zur Verstärkung der Antikörperbildung innerhalb von zwei Wochen nach der Vakzinierung enthielten einige Impfstoffe die o. g. Adjuvantien MF59® und AS03.

2.5 Chemotherapie der Influenza

Für die antivirale Therapie einer Influenzavirusinfektion gibt es verschiedene Ansätze, die in einem Review von deClerq zusammengefasst sind.⁹⁸ Derzeit stehen mit dem M2-Ionenkanalblocker Amantadin sowie den beiden Neuraminidaseinhibitoren Zanamivir und Oseltamivir zwei Substanzklassen für die Behandlung und Prophylaxe einer Influenzavirusinfektion in Deutschland zur Verfügung.⁹⁹

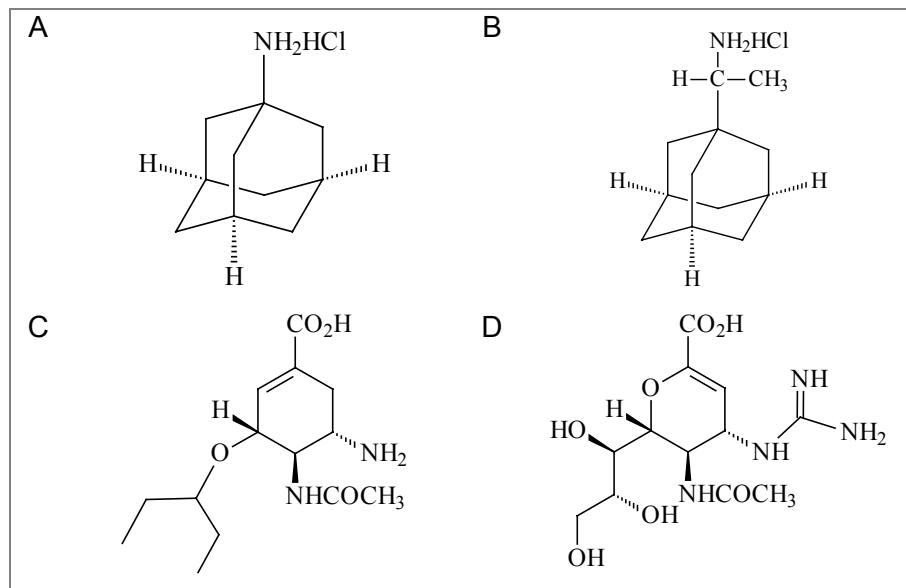


Abbildung 2: Strukturformeln der derzeit verfügbaren antiviralen Substanzen gegen die Influenza. Für die Therapie und Prophylaxe sind die M2-Ionenkanalblocker Amantadin (Symmetrel[®], A) und Rimantadin (Flumadine[®], B) sowie die Neuraminidaseinhibitoren Oseltamivir (Tamiflu[®], C) und Zanamivir (Relenza[®], D) zugelassen.

Amantadin (Abbildung 2A) war das erste zugelassene Virustatikum gegen die Influenza. Es gehört zusammen mit dem analogen Rimantadin (Abbildung 2B) zur Substanzgruppe der trizyklischen, primären Amine. Die Wirkung dieser Substanzen beruht auf der Blockade des viralen Ionenkanals M2 der FLUAV, wodurch die Virusreplikation im Stadium der Partikelaufnahme und der Freisetzung der Nukleokapside ins Zytoplasma gehemmt wird.¹⁰⁰

Für Amantadin wurden zwei unterschiedliche konzentrationsabhängige Wirkmechanismen beschrieben. Zum einen tritt in hohen Konzentrationen ($> 100 \mu\text{M}$) ein unspezifischer, genereller Effekt aller Amine auf. Sie akkumulieren in den Endosomen und erhöhen den pH-Wert, wodurch die Fusion der Virionen- mit der Endosomenmembran verhindert und die Genomfreisetzung in die Wirtszelle unterbunden wird.¹⁰¹ Der spezifische Hemmeffekt tritt in niedrigen Konzentrationen ($< 50 \mu\text{M}$) auf.¹⁰² Durch die Blockierung des M2-Ionenkanals wird die Dissoziation der Nukleokapside vom M1-Protein inhibiert, wodurch

die virale Replikation verhindert wird. Weiterhin kommt es zur Störung der HA-Reifung während des Transports vom Endoplasmatischen Retikulum zur Plasmamembran (*late effect*).¹⁰¹

Sowohl Amantadin als auch das in Deutschland nicht zugelassene Rimantadin können zur Prophylaxe und Therapie der Grippe angewandt werden.¹⁰³ Bei einer Dosierung von 200 mg/Tag für 3 – 5 Tage sind beide Substanzen therapeutisch nützlich, wenn mit der Behandlung am ersten Tag der Symptomatik begonnen wird. Unter prophylaktischem Einsatz bieten sie einen 70 – 90%igen Schutz.⁹⁹ Allerdings wurde der Gebrauch der Substanzen aufgrund der sich schnell entwickelnden Resistenzen und der zahlreichen Nebenwirkungen auf das zentrale Nervensystem (Schläfrigkeit, Depressionen, Konzentrationsstörungen, Tremor) und andere Organsysteme (Vasodepression, Herzrhythmusstörungen) sowie der Ineffizienz gegen Influenza-B-Viren auf Hochrisikogruppen beschränkt.

Unter Therapie treten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bereits nach 2 – 3 Tagen Amantadin-resistente Viren bei bis zu 30 % der behandelten Patienten auf. Die Resistenzen werden durch Mutationen im M2-Protein bedingt und beeinflussen weder die Virulenz noch die Übertragbarkeit der Viren.^{104, 105} Durch Reverse Genetik und Sequenzierung wurden die resistenzbedingenden spezifischen AS-Austausche an den Positionen 26, 27, 30, 31 und 34 im membranständigen Teil des M2-Proteins identifiziert.^{100, 106} Offenbar führen sie zu punktuellen Konformationsänderungen, die die Bindung der Virustatika im Ionenkanal verhindern.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹

Influenzaviren, die gegen Ionenkanalblocker resistent sind, wurden in der Vergangenheit selten isoliert und persistierten nur vorübergehend.^{104, 110, 111} In den letzten Jahren ist es jedoch weltweit zu einem starken Anstieg der Amantadinresistenz bei huH3N2-Virusisolaten gekommen.¹¹²⁻¹¹⁴ Während bis 2002 nur 1 – 2 % der huH3N2-Viren die Substitution S31N im M2-Protonenkanal trugen, stieg der Prozentsatz auf 15 % in der Saison 2004/05 und erreichte 90,5 % im darauffolgenden Jahr.¹¹⁵ Einer Studie deutscher huH3N2-Isolate zufolge wurde in der Bundesrepublik der erste resistente Stamm in der Saison 2003/04 isoliert.¹¹⁶ Auch bei den huH1N1-Virusisolaten konnte in der Saison 2005/06 eine Resistenzzunahme beobachtet werden.^{115, 117} So waren 71,7 % der chinesischen und 44,8 % der osteuropäischen Isolate unempfindlich gegenüber Amantadin.

Die weltweite Ausbreitung der Amantadin-resistenten huH3N2-Viren wurde durch ein 4 + 4 Reassortierungsereignis zwischen zwei verschiedenen huH3N2-Linien Anfang 2005 in Hong Kong bedingt.¹¹⁸ Zuvor war der Amantadin-resistente Subtyp über zwei Jahre in Südostasien endemisch.¹¹⁹ Durch die Reassortierung entstand die *N-lineage*, welche aufgrund des A/Wisconsin/67/2005-like HA-Oberflächenproteins höchstwahrscheinlich

eine höhere Fitness als andere zirkulierende huH3N2-Viren besitzt und sich deshalb weltweit ausbreiten konnte. Die Mechanismen zur Entstehung der Amantadinresistenz in den huH1N1-Viren sind bislang noch nicht aufgeklärt.

Die sich in den letzten Jahren stark verbreitenden aviären FLUAV des Subtyps H5N1 besitzen zum Teil ebenfalls ein Amantadin-resistentes M2-Protein,¹²⁰ welches auch bei humanen Infektionen mit diesen Viren in Thailand nachgewiesen werden konnte.¹²¹ Auch andere aviäre FLUAV der Subtypen H5, H9, H7 und H6, die in Asien und Nordamerika zwischen 2000 und 2004 isoliert wurden, waren bis zu 31,4 % Amantadin-resistent.¹²²

Wegen der aktuell angestiegenen Resistenzraten bei zirkulierenden FLUAV sowie der realen Gefahr der Resistenzentwicklung unter Therapie wird der Einsatz von Ionenkanalblockern für die breite Prophylaxe und Therapie einer Influenza sehr kritisch gesehen. In Deutschland ist Amantadin zur Prophylaxe und Therapie zugelassen, wird aber kaum angewandt.

Die Neuraminidasehemmer bilden die zweite Substanzklasse, die zur Therapie und Prophylaxe der Influenza angewandt wird.¹⁰³ Mit der Aufklärung der 3D-Struktur des NA-Oberflächenproteins Mitte der 1980er Jahre konnte gezeigt werden, dass das enzymatisch aktive Zentrum mit der Bindungsspezifität für neuraminsäurehaltige Strukturen bei allen Influenza-A- und B-Stämmen hochkonserviert ist. Das Enzym ist somit ein idealer Angriffspunkt für antivirale Hemmstoffe. Seitdem werden durch rationales *Drug Design* gezielt NA-Substratanaloga entwickelt. Die derzeit für die Therapie der Grippe zur Verfügung stehenden Neuraminidaseinhibitoren (NAI) Oseltamivir und Zanamivir (Abbildung 2C und 2D) interagieren direkt mit dem aktiven Zentrum der NA und hemmen kompetitiv die Funktion des Enzyms. Dadurch wird die Freisetzung neugebildeter Virionen von infizierten Zellen inhibiert und es kommt zur Aggregation der Viruspartikel auf der Zelloberfläche. Auch die Penetration der Viren in die Schleimhäute und die Ausbreitung auf andere Zellen wird verhindert.

Die NA-Hemmer besitzen eine breite Wirkung gegen alle NA-Subtypen der FLUAV sowie gegen Influenza-B-Viren und es treten im Vergleich zu den M2-Ionenkanalblockern weniger Nebenwirkungen auf.¹²³ Ein weiterer Vorteil besteht in der geringen Resistenzentwicklung.^{103, 123-125} Bis 1999 gab es einer globalen *Surveillance*-Studie zufolge keine natürlichen NAI-Resistenzen.¹²⁴ Laut Untersuchungen des *Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network* wiesen nur 0,33 % der Virusisolate innerhalb der ersten drei Jahre nach Zulassung der NAI zur Influenzatherapie eine reduzierte Suszeptibilität auf.¹²⁶ Bis heute wurden keine Zanamivir-resistenten FLUAV aus infizierten Personen isoliert. Einige wenige Fälle wurden für Influenza-B-Viren beschrieben.^{127, 128} Auch für Oseltamivir waren die Resistenzraten in der Vergangenheit relativ niedrig. So konnten

lediglich bei 0,4 – 1 % der Erwachsenen und 4 – 8 % der Kinder nach Oseltamivirbehandlung Viren mit reduzierter Empfindlichkeit nachgewiesen werden.¹²⁹⁻¹³¹ Eine Ausnahme stellt eine japanische Studie dar, in der bei bis zu 18 % der Kinder Oseltamivir-resistente huH3N2-Viren isoliert werden konnten.¹³² Zu einem deutlichen Anstieg der Resistenzraten gegenüber Oseltamivir auf 15 % kam es weltweit bei huFLUAV des Subtyps H1N1 in der Influenzasaison 2007/08.^{133, 134} Diese Resistenzen traten spontan auf und sind nicht mit einem Selektionsdruck unter Substanzbehandlung gekoppelt.¹³⁵ Auch bei H5N1-Isolaten und Influenza-B-Viren werden zunehmend geringere Empfindlichkeiten gegenüber Oseltamivir beobachtet.¹³⁶⁻¹³⁸

Für die Resistenzentstehung gegenüber den NA-Hemmern werden zwei Mechanismen diskutiert.¹³⁹ Einerseits induzieren spezifische AS-Austausche am katalytischen Zentrum der viralen NA oder in deren Umgebung die Resistenz gegenüber den NAI.^{140, 141} Allerdings vermindern diese Mutationen oftmals die Virulenz und Fitness der Isolate, was sich in einer Wachstumshemmung in der Zellkultur, einer reduzierten Infektiosität und niedrigeren Transmissionsraten in Tierexperimenten manifestiert.^{142, 143} Andererseits gibt es aus *In vitro*-Untersuchungen Hinweise darauf, dass Veränderungen im HA Einfluss auf die NAI-Sensitivität der Viren haben,^{125, 144, 145} da eine optimale Balance zwischen den beiden Oberflächenproteinen für eine effiziente Virusinfektion notwendig ist.¹⁶ Die nachgewiesenen AS-Austausche befinden sich häufig in der Nähe der Rezeptorbindungsstelle. Es wird vermutet, dass sie die Abhängigkeit der Viren von der Neuraminidaseaktivität bei der Virusfreisetzung von den Wirtszellen abschwächen. Die Empfindlichkeit der viralen NA gegenüber Zanamivir und Oseltamivir bleibt in diesem Fall komplett erhalten. Experimentelle Daten zur Virulenz von derart resistenten Viren sowie der Therapie dieser Infektionen mit Zanamivir und Oseltamivir *in vivo* liegen bisher nicht vor.

Die NA-Hemmer sind derzeit das Mittel der Wahl für die Therapie der Influenza. Das oral verfügbare Oseltamivir wird bei Kindern > 1 Jahr und Erwachsenen (75 mg) und Zanamivir als Inhalationspräparat bei Kindern > 12 Jahren und Erwachsenen (10 mg) zweimal täglich über einen Zeitraum von fünf Tagen verabreicht. Bei Anwendung innerhalb der ersten 48 Stunden nach dem Auftreten der Symptome bewirken sie eine deutliche Verringerung der Viruslast, so dass die Krankheitsdauer verkürzt und die Schwere der Erkrankung gemildert werden.¹⁴⁶ Oseltamivir wird in Deutschland bei Erwachsenen und Kindern > 13 Jahren einmal täglich in einer Konzentration von 75 mg für sieben Tage prophylaktisch eingesetzt.

3 Ziele der vorliegenden Arbeit

Die Möglichkeit der Koinfektion einer einzigen Zelle des porzinen Wirts mit aviären, humanen und porzinen FLUAV und die damit verbundene Gefahr zur Reassortierung und Bildung neuratiger Viren bis hin zur Entstehung pandemischer Stämme unterstreicht die besondere Bedeutung der Schweine bei der Überwindung von Wirtsbarrieren und in der Epidemiologie der Influenza. Bis zum Ausbruch der A/H1N1v-Pandemie Anfang 2009 gab es jedoch kein weltweites Surveillance der swFLUAV. Eigene Ergebnisse aus antiviralen *In vitro*-Untersuchungen wiesen auf das Zirkulieren Virustatika-resistenter swFLUAV vom Subtyp H3N2 seit Ende der 80er Jahre in Deutschland hin.¹⁴⁷

Das Hauptziel der vorliegenden Dissertation bestand nun darin, Erkenntnisse zur Empfindlichkeit von swFLUAV der Subtypen H1N1 (46 Isolate) und H1N2 (28 Isolate) gegenüber den beiden derzeit verfügbaren Substanzklassen – Adamantanamine (Amantadin) und NA-Hemmer (Oseltamivir und Zanamivir) – zu gewinnen.

Aus der Literatur war bekannt, dass in den deutschen Schweinepopulationen Viren mit *human*- und *avian-like* HA- und NA-Oberflächenproteinen zirkulieren.^{50, 51} Ein weiteres Ziel schloss die Prüfung der Virustatikaempfindlichkeit von humanen Isolaten beider Subtypen (25 H1N1- und sechs H1N2-Stämme) ein, um eine mögliche Übertragung von resistenzvermittelnden Gensegmenten von swFLUAV auf den Menschen zu analysieren.

Neben enzym- (NA-Hemmtest) und zellkulturbasierten *In vitro*-Testen (Plaquereduktionstest, Virusertragshemmtest, immunhistochemische Methoden) sollten die beiden viralen Oberflächenproteine HA und NA sowie das M-Protein sequenziert und auf mögliche Resistenzmutationen und Substitutionen analysiert werden.

Zur Überprüfung der Empfindlichkeit porziner und humaner FLUAV *in vivo* galt es Mausmodelle zu etablieren und antivirale Versuche mit ausgewählten Isolaten beider Subtypen und Oseltamivir durchzuführen.

Parallel zu den antiviralen Untersuchungen im Mausmodell sollte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Dürrwald von der IDT Biologika GmbH in Dessau-Roßlau ein *in vitro* NAI-unempfindliches porzines Isolat auf seine Oseltamivirsuszeptibilität im natürlichen Wirt untersucht werden.

Das Expressionsmuster α 2,3- und α 2,6-verknüpfter Sialinsäurerezeptoren auf den Oberflächen der Wirtszellen ist essentiell für eine effiziente Bindung und Replikation der FLUAV. Aus der Literatur gibt es Hinweise auf die Selektion bestimmter Virusvarianten bei der Vermehrung über das embryonierte Hühnerei.¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ Mittels immunhistochemischer Färbungen und FACS-Analysen sollten Unterschiede in der Rezeptorexpression verschiedener Influenza-sensitiver Zelllinien sowie im oberen (Trachea) und unteren Respirationstrakt (Lunge) von Mäusen und Schweinen detektiert werden. Weiterhin sollte

im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersucht werden, ob die Präferenz von FLUAV für einen speziellen Rezeptortyp mit der Vermehrungshistorie in verschiedenen Zelllinien und dem embryonierten Hühnerei zusammenhängt und ob sich daraus Auswirkungen auf die NAI-Empfindlichkeit der Viren ergeben.

4 Materialien

4.1 Zelllinien

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind zusammen mit ihrer Herkunft in Tabelle 2 aufgeführt. Die routinemäßige Passagierung der Zellen erfolgte durch Herrn Dr. Schacke am Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena.

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herkunft
MDBK (<i>Madine Darby Bovine Kidney</i>)	IDT Biologika GmbH, Dessau-Roßlau
MDCK (<i>Madine Darby Canine Kidney</i>)	Friedrich-Löffler-Institut, Riems
MDCK-SIAT1	Dr. Matrosovich, Philipps-Universität Marburg
NHBE (<i>normal human bronchial/tracheal epithelial cells</i>)	Lonza, Basel, CH

4.2 Viren

In dieser Arbeit wurden swFLUAV und huFLUAV der Subtypen H1N1 und H1N2 untersucht. Insgesamt standen 46 porcine H1N1- (swH1N1; Tabelle 3) und 28 porcine H1N2-Isolate (swH1N2; Tabelle 4) aus den Jahren 1981 bis 2006 von Frau Dr. Schrader (Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin) bzw. Herrn Dr. Dürrwald (IDT Biologika GmbH, Dessau-Roßlau) zur Verfügung. Unter den Viren befanden sich je zwei europäische Isolate, die als Vergleichsstämme dienten. Für alle Untersuchungen fanden die Viren der ersten MDCK-Zellkulturpassage Verwendung.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete porcine Influenza-A-Viren vom Subtyp H1N1 mit den Virustitern der Arbeitspassagen sowie den Hämagglutinationstitern bei 4 °C und 37 °C.

swH1N1-FLUAV	Titer [TCID ₅₀ /ml]	HA-Titer		Herkunft
		4 °C	37 °C	
Potsdam/1/81	2,0 x 10 ⁸	128	128	Dr. Dürrwald
Potsdam/15/81	9,4 x 10 ⁶	128	64	Dr. Schrader
Potsdam/268/81	4,3 x 10 ⁸	128	128	Dr. Dürrwald
Schwerin/103/89	2,0 x 10 ⁷	32	16	Dr. Schrader
IDT/Re230/92	8,5 x 10 ⁷	256	256	Dr. Dürrwald

Fortsetzung Tabelle 3

swH1N1-FLUAV	Titer [TCID ₅₀ /ml]	HA-Titer		Herkunft
		4 °C	37 °C	
IDT/Re230/92 Impfstamm	9,4 x 10 ⁶	128	64	Dr. Dürrwald
Gent/V230/92*	6,3 x 10 ⁵	64	64	Dr. Dürrwald
Bakum/5/95	4,3 x 10 ⁷	128	64	Dr. Schrader
Belzig/2/01-„Berlin“	6,3 x 10 ⁸	160	0	Dr. Schrader
Belzig/2/01-„Dessau“	4,3 x 10 ⁷	160	160	Dr. Dürrwald
Haselünne/IDT2617/03 hp	9,4 x 10 ⁴	64	32	Dr. Dürrwald
Vechta/IDT2653/03	6,3 x 10 ⁸	128	128	Dr. Dürrwald
Vechta/IDT2653/03 hp	9,3 x 10 ⁵	32	16	Dr. Dürrwald
Geldern/IDT2888/04	2,0 x 10 ⁸	512	256	Dr. Dürrwald
Wedel/IDT2965/04	4,3 x 10 ⁷	256	256	Dr. Dürrwald
Laer/IDT3893/05	6,3 x 10 ⁷	256	256	Dr. Dürrwald
Wohlerst/IDT4093/05	6,3 x 10 ⁵	16	16	Dr. Dürrwald
Voglarn/IDT4096/05	3,3 x 10 ⁷	128	128	Dr. Dürrwald
Kroge/IDT4192/05	6,3 x 10 ⁶	128	128	Dr. Dürrwald
Brakel-Gehrden/IDT4806/06	8,5 x 10 ⁷	1280	640	Dr. Dürrwald
Günne/IDT4847/06	8,5 x 10 ⁶	320	160	Dr. Dürrwald
Ense-Volbringen/IDT4848/06	4,3 x 10 ⁵	120	80	Dr. Dürrwald
Meppen-Teglingen/IDT4919/06	2,0 x 10 ⁷	320	160	Dr. Dürrwald
Melle/IDT5003/06	6,3 x 10 ⁵	640	320	Dr. Dürrwald
Lichtenau/IDT5045/06	1,4 x 10 ⁷	160	80	Dr. Dürrwald
Nordkirchen/IDT5062/06	9,4 x 10 ⁶	640	320	Dr. Dürrwald
Holzheim/IDT5102/06	4,3 x 10 ⁷	80	80	Dr. Dürrwald
Ortensburg/IDT5144/06	1,2 x 10 ⁸	160	80	Dr. Dürrwald
Südlohn/IDT5508/06	9,4 x 10 ⁶	0	0	Dr. Dürrwald
Rotthalmünster/IDT5536/06	2,0 x 10 ⁶	40	0	Dr. Dürrwald
Ramsberg/IDT5544/06	9,4 x 10 ⁴	20	0	Dr. Dürrwald
Friesoythe/IDT5548/06	6,3 x 10 ⁷	640	640	Dr. Dürrwald
Friesoythe/IDT5549/06	9,4 x 10 ⁵	320	320	Dr. Dürrwald
Kassel/IDT5550/06	6,3 x 10 ⁷	640	640	Dr. Dürrwald
Altenaffeln/IDT5551/06	9,4 x 10 ⁶	1280	640	Dr. Dürrwald
Ostercappeln/IDT5553/06	4,3 x 10 ⁶	1280	640	Dr. Dürrwald
Balve/IDT5603/06	4,3 x 10 ⁷	640	640	Dr. Dürrwald

Fortsetzung Tabelle 3

swH1N1-FLUAV	Titer [TCID ₅₀ /ml]	HA-Titer		Herkunft
		4 °C	37 °C	
Bad Griesbach/IDT5604/06	4,3 x 10 ⁷	640	640	Dr. Dürrwald
Gütersloh/IDT5610/06	6,3 x 10 ⁶	160	80	Dr. Dürrwald
Rotthalmünster/IDT5616/06	2,0 x 10 ⁷	640	640	Dr. Dürrwald
Feldbach Austria/IDT5625/06*	6,3 x 10 ⁸	1280	1280	Dr. Dürrwald
Schloß Holte/IDT5647/06	2,0 x 10 ⁸	1280	640	Dr. Dürrwald
Nordhorn/IDT5657/06	9,4 x 10 ⁷	1280	1280	Dr. Dürrwald
Borgholzhausen/IDT5751/06	9,4 x 10 ⁴	160	160	Dr. Dürrwald
Wadersloh-Liesborn/IDT5761/06	2,0 x 10 ⁴	160	160	Dr. Dürrwald
Ennigerloh/IDT5803/06	6,0 x 10 ⁷	640	640	Dr. Dürrwald

* Vergleichsstamm; hp = hochpassagiert

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete porcine Influenza-A-Viren vom Subtyp H1N2 mit den Virustitern der Arbeitspassagen sowie den Hämagglutinationstitern bei 4 °C und 37 °C.

swH1N2-FLUAV	Titer [TCID ₅₀ /ml]	HA-Titer		Herkunft
		4 °C	37 °C	
England/17394/96*	4,3 x 10 ⁸	256	256	Dr. Dürrwald
Gent/7625/99*	9,4 x 10 ⁸	64	64	Dr. Dürrwald
Bakum/1832/00	6,3 x 10 ⁷	64	0	Dr. Schrader
Bakum/1833/00	3,3 x 10 ⁷	64	0	Dr. Schrader
Norden/IDT2308/03	6,3 x 10 ⁵	64	64	Dr. Dürrwald
Nordwalde/IDT2197/03	9,4 x 10 ⁶	64	64	Dr. Dürrwald
Waltersdorf/IDT2527/03	3,3 x 10 ⁴	64	32	Dr. Dürrwald
Löningen/IDT2530/03	9,4 x 10 ⁷	128	64	Dr. Dürrwald
Ehren/IDT2570/03	1,2 x 10 ⁷	128	64	Dr. Dürrwald
IVD/IDT2674/03	1,4 x 10 ⁷	128	128	Dr. Dürrwald
Gescher/IDT2702/03	6,3 x 10 ⁷	128	128	Dr. Dürrwald
Visbek/IDT/2869/03	1,2 x 10 ⁸	256	128	Dr. Dürrwald
Gudensberg/IDT2930/04	4,3 x 10 ⁷	32	32	Dr. Dürrwald
Gudensberg/IDT2931/04	9,4 x 10 ⁶	128	64	Dr. Dürrwald
Stolzenau/IDT3296/04	2,0 x 10 ⁹	128	64	Dr. Dürrwald
Granstedt/IDT3475/04	9,4 x 10 ⁶	64	64	Dr. Dürrwald

Fortsetzung Tabelle 4

swH1N2-FLUAV	Titer [TCID ₅₀ /ml]	HA-Titer		Herkunft
		4 °C	37 °C	
Nortrup/IDT3685/04	9,4 x 10 ⁷	256	128	Dr. Dürrwald
Dötlingen/IDT3780/05	4,3 x 10 ⁷	256	128	Dr. Dürrwald
Spence/IDT3805/05	6,0 x 10 ⁶	128	64	Dr. Dürrwald
Stadtlohn/IDT3853/05	9,4 x 10 ⁵	128	128	Dr. Dürrwald
Dötlingen/IDT4735/05	6,3 x 10 ⁸	1280	1280	Dr. Dürrwald
Cloppenburg/IDT4777/05	1,4 x 10 ⁸	1280	1280	Dr. Dürrwald
Ostercappeln/IDT5518/06	4,3 x 10 ⁶	40	0	Dr. Dürrwald
Bocholt-Barlo/IDT5533/06	9,4 x 10 ⁴	0	0	Dr. Dürrwald
Geseke/IDT5638/06	6,3 x 10 ⁷	160	80	Dr. Dürrwald
Haltern-Sythen/IDT5670/06	2,0 x 10 ⁸	1280	640	Dr. Dürrwald
Velen/IDT5730/06	6,3 x 10 ⁷	320	160	Dr. Dürrwald

* Vergleichsstamm

Die 25 humanen H1N1- (huH1N1; Tabelle 5) und sechs H1N2-Isolate (huH1N2; Tabelle 6) kamen aus den Stammsammlungen des nationalen Referenzlabors für Influenzaviren am Robert-Koch-Institut (RKI) Berlin und dem Niedersächsischen Landesgesundheitsamt in Hannover (Kooperation mit Frau Dr. Schweiger und Herrn Dr. Heckler). Die Viren wurden zweimal auf MDCK-Zellen vermehrt und alle Untersuchungen mit der zweiten Zellkulturpassage durchgeführt. Als H1N1-Vergleichsstämme dienten das Isolat A/Puerto Rico/8/34 (Institut für Virologie, Philipps-Universität Marburg) und die Impfstämme A/Bayern/7/95 und A/New Caledonia/20/99, die vom RKI zur Verfügung gestellt wurden.

Tabelle 5: In dieser Arbeit untersuchte humane Influenza-A-Viren vom Subtyp H1N1 mit den Virustitern der Arbeitspassagen sowie den Hämagglutinationstitern bei 4 °C und 37 °C.

huH1N1-FLUAV	Titer [TCID ₅₀ /ml]	HA-Titer		Herkunft
		4 °C	37 °C	
Puerto Rico/8/34*	6,3 x 10 ⁶	256	256	Marburg
Bayern/7/95*	6,3 x 10 ⁶	16	0	RKI
New Caledonia/20/99*	9,4 x 10 ⁴	16	0	RKI
Nordrhein-Westfalen/6/05	2,0 x 10 ⁷	128	64	RKI
Berlin/18/05	8,5 x 10 ⁷	32	8	RKI
Hamburg/1/05	6,3 x 10 ⁵	32	8	RKI
Thüringen/40/05	3,3 x 10 ⁶	2	0	RKI

Fortsetzung Tabelle 5

huH1N1-FLUAV	Titer [TCID ₅₀ /ml]	HA-Titer		Herkunft
		4 °C	37 °C	
Hessen/4/05	4,3 x 10 ⁷	32	16	RKI
Berlin/60/05	4,3 x 10 ⁸	128	0	RKI
Bremen/5/05	4,3 x 10 ⁷	32	8	RKI
Bremen/4/05	3,3 x 10 ⁷	32	0	RKI
Sachsen/14/05	1,2 x 10 ⁷	16	4	RKI
Rheinland-Pfalz/58/05	2,0 x 10 ⁷	32	16	RKI
Niedersachsen/191/05	4,3 x 10 ⁶	8	0	Hannover
Niedersachsen/192/05	1,1 x 10 ⁷	0	0	Hannover
Niedersachsen/202/05	4,3 x 10 ⁷	64	16	Hannover
Niedersachsen/217/05	9,4 x 10 ⁶	64	16	Hannover
Niedersachsen/218/05	6,3 x 10 ⁵	0	0	Hannover
Baden-Württemberg/3/06	9,4 x 10 ⁵	8	4	RKI
Baden-Württemberg/5/06	3,3 x 10 ⁵	0	0	RKI
Baden-Württemberg/4/06	9,4 x 10 ⁶	64	16	RKI
Brandenburg/1/06	9,4 x 10 ⁶	16	0	RKI
Rheinland-Pfalz/1/06	8,5 x 10 ⁶	0	0	RKI
Berlin/9/06	9,4 x 10 ⁵	32	0	RKI
Berlin/6/06	6,3 x 10 ⁵	0	0	RKI
Berlin/13/06	4,3 x 10 ⁵	16	16	RKI
Niedersachsen/4/06	6,3 x 10 ⁴	32	0	RKI
Niedersachsen/5/06	9,4 x 10 ⁴	64	8	RKI

* Vergleichsstamm

Tabelle 6: In dieser Arbeit untersuchte humane Influenza-A-Viren vom Subtyp H1N2 mit den Virustitern der Arbeitspassagen sowie den Hämagglutinationstitern bei 4 °C und 37 °C.

huH1N2-FLUAV	Titer [TCID ₅₀ /ml]	HA-Titer		Herkunft
		4 °C	37 °C	
Baden-Württemberg/20/03	9,4 x 10 ⁷	128	0	RKI
Rheinland-Pfalz/34/03	1,4 x 10 ⁸	16	0	RKI
Sachsen/678/03	4,3 x 10 ⁸	256	256	RKI
Baden-Württemberg/129/03	9,4 x 10 ⁸	64	0	RKI
05.03.02/Sachsen	4,3 x 10 ⁶	32	0	RKI
11.03.02/Sachsen	2,0 x 10 ⁷	16	0	RKI

4.3 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer (Tabelle 7) wurden am Institut für Virologie und Antivirale Therapie des Universitätsklinikums Jena von Dr. Birch-Hirschfeld synthetisiert. Für die genotypischen Analysen der Influenzaviren fanden sowohl in der Literatur beschriebene genomspezifische Oligonukleotide¹⁵¹ als auch sequenzspezifisch generierte Primer Anwendung.

Tabelle 7: Verwendete Primer für die Reverse Transkription (RT), Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sequenzierung (Seq).

Primer	Sequenz in 5'-3'-Orientierung	Einsatz
<u>1) Reverse Transkription:</u>		
Uni12 ^a	AGCAAAAGCAGG	RT
oligo dT	18xdT	RT
<u>2) Amplifikation und Sequenzierung humaner H1-Genomsegmente:</u>		
Bm-HA-1 ^a	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG	PCR, Seq
H1-67F	GGCTACCATGCCAACAACCTCAACCG	Seq
H1-413F	GCTCATGGCCCAACCACACCGTAACC	Seq
H1-790F	CCCGGGGACACAATAATATTTGAGGC	PCR, Seq
H1-1048F	GCCGGTTTCATTGAAGGGGGCTGGACTGG	Seq
H1-1066F	GGGGGGTGGACTGGAATGATGG	Seq
H1-1346F	GGACTTTGGATTTCCATGACTCC	Seq
H1-349R	CCTCATAGTCGGCGAAATACCCTGGG	Seq
H1-695R	GCTATTTCTGGGGTGAATCTTCTGC	Seq
H1-1091R	CCATCCATCATTCCAGTCCACCCCCC	PCR, Seq
Bm-NS-890R ^a	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT	PCR
<u>3) Amplifikation und Sequenzierung humaner N1- und N2-Genomsegmente:</u>		
Ba-NA-1 ^a	TATTGGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGAGT	PCR, Seq
N1-255F	GGCCGGCAATTCATCTCTTTGTTCTATCAGTGGATGGGC	Seq
N1-460F	GGAACCGTTAAGGACAGAAGTCCTTATAGGGC	Seq
N1-887F	GGCATGGTTCAAATCGACCTTGGG	PCR, Seq
N1-461R	GGACTTCTGTCCTTAACGGTCCC	Seq
N1-471R	GGCCCTATAAGGGCTTCTGTCCTTAACGG	Seq
N1-1171R	CGGTATCTGTCCATCCATTAGGATCCC	PCR
N2-390F	GCGATCCTGACAAGTGTTATCAATTTGCCC	Seq
N2-808F	GGGAGTGACYAACATGTAGAGGAG	PCR, Seq

Fortsetzung Tabelle 7

Primer	Sequenz in 5'-3'-Orientierung	Einsatz
N2-1088R	CCCATCCACACGTCATTTCCATCATCAAAGGCC	PCR
Ba-NA-1413R ^a	ATATGGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGAGTTTTT	PCR
<u>4) Amplifikation und Sequenzierung des M-Genomsegmentes:</u>		
Bm-M-1 ^a	TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGTAG	PCR, Seq
M352F	CCATGGGGCCAAAGAAATAGCACTC	Seq
Bm-M-1027R ^a	ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGTAGTTTTT	PCR
<u>5) Amplifikation und Sequenzierung porziner H1-Genomsegmente:</u>		
HAH1-F1 ^b	GCAAAAGCAGGGGAAAATAAAAACAACC	Seq
HAH1-313F	GGAGCATGCTACCCCGGAGAATTCGC	Seq
HAH1-R3 ^b	TGGGATGTACGTTCTGAAAAGGAAG	PCR
HAH1-F4 ^b	AGCCACTGGGAACCTTAATAGCACC	PCR, Seq
HAH1-R4a ^b	GAACACATCCAGAAGCTGATTGCC	PCR
<u>6) Amplifikation und Sequenzierung porziner N1- und N2-Genomsegmente:</u>		
NAN1-F1 ^b	TTGGAAACATAATCTCAATATGG	Seq
NAN1-R1 ^b	GCCCATTACTTGGTCCATCGGTC	PCR
NAN1-F2 ^b	ATACAATGGCATAATAACAGACAC	PCR, Seq
N2-R2 ^b	CAACAATACTGTTTGAGGTCCACC	Seq
N2-2F ^b	TAAAAATGCAACTGCTAGCTTCATTTA	PCR, Seq
Radl.HA-324F	CCCAGGGTATTTCTCCGACTATGAGG	Seq
<u>7) Amplifikation von <i>housekeeping</i>-Genen:</u>		
mu β -Aktin s ^c	ATGGATGACGATATCGCT	PCR
mu β -Aktin as ^c	ATGAGGTAGTCTGTCAGGT	PCR
GAP-DH s	AATGCCTCCTGCACCACC	PCR
GAP-DH as	ATGCCAGTGAGCTTCCCG	PCR

^a genomspezifische Oligonukleotide,¹⁵¹ ^b PD Dr. Zell (Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Universitätsklinikum Jena), ^c Nucleic Acids Res. 14(6): 2829¹⁵²

4.4 Chemikalien und Grundstoffe

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation in ihrer Wirksamkeit gegenüber den humanen und porzinen FLUAV *in vitro* und *in vivo* in der Maus untersuchten Testsubstanzen sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Für die antivirale Behandlung virusinfizierter Schweine wurde der Wirkstoff Oseltamivir-Phosphat in seiner Handelsform als Hartkapsel (Tamiflu[®], F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH) verwendet.

Tabelle 8: Verwendete Testsubstanzen und deren Molekulargewichte

Substanz	Molekulargewicht	Herkunft
Amantadin	187,7 g/mol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Oseltamivir-Karboxylat (Ro64-802)	386,4 g/mol	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Oseltamivir-Phosphat (Ro64-0796)	410,4 g/mol	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Zanamivir (GG167)	332,3 g/mol	GlaxoSmithKline, Uxbridge, UK

Der Impfstoff RESPIPORC FLU3 (IDT Biologika GmbH, Dessau-Roßlau) ist ein trivalentes Vakzin bestehend aus den Komponenten A/swine/Bakum/IDT1769/03 hp (H3N2), A/swine/Bakum/1832/00 hp (H1N2) und A/swine/Haselünne/IDT2617/03 hp (H1N1).

Tabelle 9: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
1-bromo-3-chloropropane (BCP)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
2-Mercaptoethanol	Ferak, Berlin
2-Morpholinoethansulfonsäure (MES)	Merck, Darmstadt
2-Propanol	Carl Roth, Karlsruhe
Agar, gereinigt	Difco Laboratories, Augsburg
Agarose	Peqlab Biotechnologies, Erlangen
Borsäure	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid ($\text{CaCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$)	Carl Roth, Karlsruhe
Diethylether	Otto Fischer, Saarbrücken
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Buchs, CH
EDTA	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Eosin	Merck, Darmstadt
Formaldehyd 37 %	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerolgelatine	Serva, Heidelberg
Glyzerin 87 %	Ferak, Berlin
Hämatoxylin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isofluran	Baxter, Unterschleißheim

Fortsetzung Tabelle 9

Bezeichnung	Hersteller
Kaliumchlorid (KCl)	VEB Laborchemie, Apolda
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kaolin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	VEB Laborchemie, Apolda
Mangan-II-chlorid (MnCl ₂ x 4 H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Methanol	I. T. Baker, Deventer, NL
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	VEB Laborchemie, Apolda
Rinderserumalbumin (RSA)	Serva, Heidelberg
Saponin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Shandon Histoplast Paraffin	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Shandon Hypermount™	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Tris	Serva, Heidelberg
Triton-X100	Serva, Heidelberg
Trypsin	Berlin Chemie, Berlin
Wasser für Molekularbiologie, DEPC-behandelt	Carl Roth, Karlsruhe
Xylol	Merck, Darmstadt

Tabelle 10: Zellkulturmedien und -zusätze

Bezeichnung	Hersteller
BEBM®	Lonza, Basel, CH
BEGM® BulletKit®	Lonza, Basel, CH
BEGM® SingleQuots®	Lonza, Basel, CH
Bikarbonat	Lonza, Basel, CH
BioWhittaker® DMEM	Lonza, Basel, CH
BioWhittaker® EMEM	Lonza, Basel, CH
BioWhittaker® Penicillin-Streptomycin Mixture	Lonza, Basel, CH
FKS	PAA, Cölbe
G-418 Sulfat	PAA, Cölbe
Gibco® 10x MEM	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Lonza, Basel, CH

Fortsetzung Tabelle 10

Bezeichnung	Hersteller
Na-Pyruvat	Lonza, Basel, CH
NEAA	Lonza, Basel, CH
Trypsin	Lonza, Basel, CH

Tabelle 11: Kommerziell erhältliche Testsysteme

Bezeichnung	Hersteller
Dako REAL™ Detection System APAAP Mouse	Dako, Hamburg
DIG Glycan Differentiation Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
GenomeLab™ DTCS Quick Start Kit	Beckman Coulter, Krefeld
HotStar® Taq DNA Polymerase Kit	Qiagen, Hilden
NA-Star® Influenza Neuraminidase Inhibitor	Applied Biosystems, Darmstadt
Resistance Detection Kit	
NOVADetect DAB Substrate System	Dianova, Hamburg
NOVADetect Large Volume Detection System anti-Rabbit	Dianova, Hamburg
Omniscript® RT Kit	Qiagen, Hilden
Q-BioTaq CORE Kit 10	MP Biomedicals, Heidelberg
QIAquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNA/later® RNA Stabilization Solution	Applied Biosystems, Darmstadt
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
TRI Reagent® Solution	Applied Biosystems, Darmstadt
Tropix Light Emission Accelerator II	Applied Biosystems, Darmstadt

Tabelle 12: Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Goat anti-mouse IgG Peroxidase Conjugate	Calbiochem®, Merck, Darmstadt
monoklonal mouse anti-β-Tubulin IV	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
monoclonal mouse anti-Digoxigenin	Roche Diagnostics, Mannheim
monoclonal mouse anti-Influenza A nucleoprotein	Acris Antibodies, Herford
polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins/FITC	Dako, Hamburg
polyclonal rabbit anti-mouse immunoglobulins/FITC	Dako, Hamburg

4.5 Puffer und Lösungen

Vermehrungsmedien für Zellkulturen:

- **MDBK:** EMEM mit Zusatz von je 100 U/ml Penicilin und Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10 % FKS sowie 1 ml/100 ml NEAA
- **MDCK:** EMEM mit Zusatz von je 100 U/ml Penicilin und Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 10 % FKS, 1 ml/100 ml Na-Pyruvat sowie 1 ml/100 ml NEAA
- **MDCK-SIAT1:** DMEM mit Zusatz von je 100 U/ml Penicilin und Streptomycin, 10 % FKS sowie 1 mg/ml G-418
- **NHBE:** BEGM[®] BulletKit[®]; im *Air Liquid Interface*: BEGM[®]:DMEM-Gemisch (DMEM mit BEGM[®] SingleQuots[®] versetzt, 1 : 1 mit BEGM[®] gemischt)

Testmedien für virologische Untersuchungen mit FLUAV:

- **MDBK und MDCK:** EMEM mit Zusatz von je 100 U/ml Penicilin und Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, sowie 2 µg/ml Trypsin und 1,2 mM Bikarbonat
- **NHBE im Air Liquid Interface:** entspricht Vermehrungsmedium

Lösungen für Zellkulturen:

- **Kristallviolett/Formalin-Stammlösung:** 12,5 g Kristallviolett + 25 ml Ethanol + 175 ml 37%iges Formalin + 300 ml Aqua bidest.
- **Kristallviolett/Formalin-Gebrauchslösung:** 50 ml Stammlösung + 35 ml 37%iges Formalin + 420 ml Aqua bidest.

Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten:

- **5x TBE-Puffer:** 54 g Tris + 27,5 g Borsäure + 4,65 g EDTA mit Aqua bidest. auf 1.000 ml auffüllen; pH 8,0
- **6x DNA-Ladepuffer:** 12,5 mg Bromphenolblau + 1,72 ml 87%iges Glyzerin + 3,5 ml 10 mM EDTA; pH 8,0

Puffer und Lösungen für immunhistochemische Verfahren:

- **PBS:** 8 g NaCl + 0,2 g KCl + 1,14 g Na₂HPO₄ + 0,2 g KH₂PO₄ mit Aqua bidest. auf 1.000 ml auffüllen
- **Ionenlösung für PBS:** 0,5 g CaCl₂ x 6 H₂O + 0,5 g MgCl₂ x 6 H₂O mit Aqua bidest. auf 1.000 ml auffüllen
- **PBS + Ionen:** 4 Teile PBS + 1 Teil Ionenlösung
- **TBS:** 0,05 M Tris + 0,15 M NaCl; pH 7,5
- **FACS-Puffer:** TBS mit 1 mM MgCl₂ x 6 H₂O, 1 mM MnCl₂ x 4 H₂O, 1 mM CaCl₂ x 6 H₂O; pH 7,5
- **Puffer 2:** 0,1 M Tris-HCl + 0,005 M MgCl₂ x 6 H₂O + 0,1 M NaCl; pH 9,5

5 Methoden

5.1 Methoden für die Zellkultur und virologische Arbeiten

5.1.1 Zellkultivierung

Für die virologischen Arbeiten erfolgte die Kultivierung der MDCK-Zellen mit einer Zellzahl von $\sim 2,3 \times 10^5$ Zellen/ml im Brutschrank unter Standardbedingungen bei 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer Luftfeuchte von 95 %. Die Inkubationszeit bis zur Konfluenz betrug ca. drei Tage. Vor der Infektion mit FLUAV wurden die Monolayer einmal mit EMEM gewaschen und das serumfreie Testmedium zugesetzt.

Entsprechend einer Publikation von Gray *et al.*¹⁵³ bedurfte die Proliferation der NHBE-Zellen einer Zellaussaat mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen/cm² in Costar® Transwell® Clear Gewebekulturplatten mit Einsätzen von 6 bzw. 24 mm Durchmesser und einer Porengröße von 0,4 µm (Corning, New York, USA). Die Kultivierung erfolgte in einem BEGM®:DMEM-Mediengemisch (DMEM mit BEGM® SingleQuots® versetzt, 1 : 1 mit BEGM® gemischt) mit täglichem Medienwechsel. Für die Differenzierung der Zellen musste das Wachstum in einem sogenannten *Air-Liquid Interface* stattfinden, was durch Trockensaugen des oberen Kompartiments nach acht Tagen Inkubationszeit bewirkt wurde. Nach 4 – 5 Wochen Wachstum unter Standardbedingungen besaßen die ausdifferenzierten Zellen ihre schleimbildende Eigenschaft. Vor Verwendung wurden die Zellen intensiv mit PBS gespült, um den Schleim auf ihrer Oberfläche zu entfernen.

5.1.2 Färbung und Fixierung von Zellen

Zur Auswertung der virologischen Versuche wurden die Zellen zu Versuchende mit Kristallviolett/Formalin-Lösung versetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Adhärenz Zellen können durch Kristallviolett angefärbt und durch Formalin an der Oberfläche des Zellkulturgefäßes fixiert werden. Zudem bewirkt Formalin die Inaktivierung des noch vorhandenen Virus. Der basische Farbstoff Kristallviolett färbt die nukleinsäurehaltigen Regionen der Zellen an. Die Färbung ist mit einer Genauigkeit von 500 Zellen sehr sensitiv, einfach und schnell.

Zur Fixierung der Zellen für die immunhistochemischen Färbungen erfolgte eine zehnminütige Inkubation mit eiskaltem Methanol und anschließend dreimaligem Waschen mit PBS + Ionen.

5.1.3 Virusvermehrung

Zur Vermehrung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Viren wurden 250 µl Virus in 2,5 ml Testmedium auf MDCK-Zellmonolayer in T₂₅-Zellkulturflaschen gegeben, 1 h unter Standardbedingungen inkubiert, anschließend das virushaltige Medium entfernt und die Zellen mit 5 ml Testmedium versetzt. Bei Ausbildung des vollständigen zytopathischen Effekts (zpE) nach 24 – 72-stündiger Inkubation unter Standardbedingungen wurde der virushaltige Überstand aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

5.1.4 Quantitativer Virusnachweis

Endverdünnungsmethode nach Reed und Muench

Zur Titerbestimmung von Virussuspensionen kann die kulturinfektiöse Dosis TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose) verwendet werden. Diese gibt die Verdünnung einer virushaltigen Lösung an, die ausreicht um 50 % der jeweiligen Versuchseinheiten zu infizieren.

Für den Test bedurfte es konfluente MDCK-Zellmonolayer in Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen. 100 µl Testmedium in je vier Vertiefungen pro Verdünnungsstufe wurden mit 50 µl einer logarithmisch abgestuften Virusverdünnungsreihe versetzt, die infizierten Zellkulturen 96 h unter Standardbedingungen inkubiert und anschließend mit Kristallviolett/Formalin-Lösung gefärbt. Für die Auswertung war es wichtig, dass eine gesamte Testgruppe positiv und eine gesamte Testgruppe negativ reagierte. Zwischen diesen beiden Verdünnungsstufen lag die TCID₅₀, die mithilfe mathematischer Verfahren nach Reed und Muench¹⁵⁴ näherungsweise bestimmt werden konnte.

Virustierbestimmung mittels Plaquetest

Der Plaquetest stellt eine zweite Methode zum quantitativen Nachweis infektiöser Viren dar. Plaques sind Löcher im Zellrasen, die durch die Lyse der Zellen infolge der Virusvermehrung entstehen und durch das Färben der Zellen mit Kristallviolett/Formalin-Lösung sichtbar werden.

Konfluente MDCK-Zellen in Zellkulturplatten mit zwölf Vertiefungen wurden mit 500 µl einer logarithmisch abgestuften Virusverdünnungsreihe (2fach-Bestimmung) infiziert, das Inokulum nach einstündiger Inkubation unter Standardbedingungen entfernt und die Zellen mit 1 ml 0,4%igem Agarmedium pro Vertiefung überschichtet. Nach 48 – 72-stündiger Inkubation unter Standardbedingungen erfolgte die Färbung der infizierten Zellkulturen mit Kristallviolett/Formalin-Lösung. Die visuelle Auswertung wurde über dem Lichtkasten durchgeführt.

Hämagglutinationstest

Der Hämagglutinationstest stellt eine quantitative Methode zur Bestimmung der Antigenaktivität in Virussuspensionen dar. Die Hämagglutination beruht auf der Eigenschaft bestimmter Viren Erythrozyten zu agglutinieren. Sie wurde erstmals 1941 von Hirst für Influenzaviren beschrieben.¹⁵⁵ FLUAV binden über das HA an Glykoproteinrezeptoren auf der Erythrozytenoberfläche. Durch die Bindung werden die Erythrozyten quervernetzt und agglutinieren.

In Zellkulturplatten mit 96 Vertiefungen und rundem Boden (Greiner, Frickenhausen) wurden je 50 µl einer Virusverdünnungsreihe (Faktor 2) in 0,9 % NaCl mit 50 µl Hühnererythrozytensuspension (C-C-Pro, Oberdorla, 3mal mit 0,9 % NaCl gewaschen und auf eine 1%ige Lösung eingestellt) versetzt, 1 h parallel bei 4 °C bzw. 37 °C inkubiert und die Hämagglutination visuell durch Ablesen der netzartigen Sedimentformationen ausgewertet. Das Reziproke der höchsten Virusverdünnung, die eine Hämagglutination bewirkte, entspricht dabei einer hämagglutinierenden Einheit (*hämagglutinating unit*, HAU) und ergab den Hämagglutinationstiter.

5.1.5 Methoden für Dosis-Wirkungs-Untersuchungen

Plaquereduktionstest

Der Plaquereduktionstest wird für Dosis-Wirkungs-Untersuchungen von antiviral wirksamen Substanzen eingesetzt.¹⁵⁶ Die Infektion von MDCK-Zellmonolayern in Zellkulturplatten mit zwölf Vertiefungen erfolgte mit einer gut auszählbaren Dosis plaquebildender Einheiten des Testvirus in 500 µl Testmedium. Nach einstündiger Virusadsorption unter Standardbedingungen wurden die infizierten Zellen mit 1 ml eines Substanz/Agar-Gemisches (doppeltkonzentrierte Substanzverdünnungsreihe in 2x EMEM mit 0,8%igem Agar im Verhältnis 1 : 1 gemischt) überschichtet. Nach 48 – 72-stündiger Inkubation der Gewebekulturplatten unter Standardbedingungen und Färbung der Zellen mit Kristallviolett/Formalin-Lösung erfolgte das Auszählen der Plaques über dem Lichtkasten.

Die antivirale Substanzwirkung konnte durch die Berechnung der prozentualen Plaquereduktion anhand des Mittelwertes der ausgezählten Plaques von infizierten unbehandelten Kontrollaktivitäten, die gleich 100 % gesetzt wurden, ausgewertet werden. Das Auftreten einer dosisabhängigen Reduktion der Plaquezahlen im Vergleich zur unbehandelten Viruskontrolle wurde als antivirale Wirksamkeit eingeschätzt. Anhand der erhaltenen Daten konnte die 50%ige Hemmkonzentration der Substanz (IC₅₀) bestimmt werden.

Virusertragshemmtest

Eine durch antiviral wirksame Substanzen bewirkte Virustiterreduktion kann im Virusertragshemmtest ermittelt werden.

Zum einen wurden MDCK-Zellmonolayer in Gewebekulturplatten mit 96 Vertiefungen mit einer *multiplicity of infection* (MOI) infiziert, die in der Ausbildung eines zytopathischen Effektes 14 bzw. 48 h nach der Infektion resultierte. Nach einstündiger Inkubation unter Standardbedingungen konnte das Inokulum entfernt und die Zellen dreimal mit EMEM gewaschen werden, bevor das Testmedium, welches verschiedene logarithmische Substanzkonzentrationen (0 – 10 µg/ml) enthielt, zugegeben wurde. Nach 14 bzw. 48 h Versuchsdauer erfolgte die Bestimmung der Virustiter der Zellkulturüberstände nach der Endverdünnungsmethode.

Weiterhin fand dieser Test auf ausdifferenzierten NHBE-Zellen in Costar® Transwell® Clear Gewebekulturplatten mit Einsätzen von 6 mm Durchmesser und einer Porengröße von 0,4 µm (Corning, New York, USA) Anwendung, die entsprechend einer Publikation von Ilyushina et al. mit einer MOI von 0,1 TCID₅₀/Zelle im oberen Kompartiment für 1 h inokuliert wurden.¹⁵⁷ Anschließend erfolgte die Substanzbehandlung analog zu den Testen auf MDCK-Zellen. Dabei lag das Testmedium mit den verschiedenen logarithmischen Substanzkonzentrationen ausschließlich im unteren Kompartiment vor. 24 h nach der Virusinfektion wurden 100 µl BEGM®:DMEM-Medium in das obere Kompartiment gegeben, die Gewebekulturplatten für 30 min bei 37 °C inkubiert und die Viruslast in diesen 100 µl mittels Titration auf MDCK-Zellen nach Reed und Muench bestimmt.

Neuraminidase-Hemmtest

Mit dem NA-Hemmtest unter Verwendung des kommerziell erhältlichen Testsystems NA-Star® Influenza Neuraminidase Inhibitor Resistance Detection Kit kann direkt die Empfindlichkeit des viralen Oberflächenproteins gegenüber den Inhibitoren Oseltamivir und Zanamivir bestimmt werden. Die Methode nutzt das 1,2-Dioxetan-Derivat der Sialinsäure (NA-Star®) als Substrat für die virale NA. Bei Zugabe des Light Emission Accelerator II entsteht ein Lumineszenz-Signal, welches im MLX Microtiter® Plate Luminometer (Dynex Technologies, Chantilly, Virginia, USA) gemessen wird.

Zur Bestimmung der NA-Aktivität der Viren wurden Virusverdünnungsreihen (Faktor 2) in 25 µl Testpuffer (26 mM MES; pH 6,0 + 4 mM CaCl₂) in weißen Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen und rundem Boden (Nunc, Langenselbold) angelegt und mit 25 µl Testpuffer auf 50 µl Reaktionsansatz gebracht. Nach Zugabe von 5 µl 0,02 mM NA-Star® wurde der Ansatz 2 min bei Raumtemperatur auf dem IKA®-Schüttler MTS2 gemischt und anschließend für 30 min zur Reaktion gebracht. Mit 55 µl Light Emission Accelerator II

versetzt konnte die resultierende Lumineszenz am Luminometer gemessen und die NA-Aktivität bestimmt werden. Für die anschließende Ermittlung der 50%igen Hemmkonzentration der beiden NAi Oseltamivir und Zanamivir bedurfte es einer Enzymaktivität, die einem Signal-Hintergrund-Verhältnis von 40 : 1 entsprach. Die untersuchten Substanzkonzentrationen lagen bei diesem Test zwischen 10 und 0,03 nM (halblogarithmische Verdünnungsreihe). In einer 3fach-Bestimmung wurden 25 µl der entsprechenden Substanz, verdünnt in Testpuffer mit 25 µl Virussuspension versetzt und 2 min bei Raumtemperatur auf dem IKA®-Schüttler MTS2 gemischt. Während einer 20-minütigen Inkubationsphase bei 37 °C reagierten die Testsubstanzen mit der viralen NA. Zur Bestimmung der NA-Hemmung wurde nach dieser Zeit wie zuvor beschrieben mit der Zugabe des NA-Star®-Substrates entsprechend dem Protokoll fortgefahren und die Lumineszenz ermittelt. Im Test liefen sechs unbehandelte Viruskontrollen mit.

Die Substanzwirkung konnte durch die Berechnung der prozentualen NA-Hemmung anhand der mittleren Lumineszenzwerte der unbehandelten Viruskontrollen, die gleich 100 % gesetzt wurden, ausgewertet werden. Das Auftreten einer dosisabhängigen Reduktion der Lumineszenzen wurde als antivirale Wirksamkeit eingeschätzt und anhand der erhaltenen Daten die IC₅₀-Werte für beide Testsubstanzen bestimmt.

5.2 *In vivo*-Untersuchungen im Mausmodell

Alle *In vivo*-Untersuchungen wurden an 6 – 8 Wochen alten weiblichen BALB/c-Mäusen (Forschungszentrum Lobeda, Universitätsklinikum Jena; Charles River Laboratories, Sulzfeld) unter S2-Bedingungen in der Tierinfektionseinheit 2 des Forschungszentrums Beutenberg (Universitätsklinikum Jena) durchgeführt. Die Haltung erfolgte in Gruppen von je fünf Tieren bei 22 ± 2 °C und einer relativen Luftfeuchte von 55 ± 10 % in einzelbelüfteten (IVC)-Käfigen. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug zwölf Stunden bei künstlichem Licht. Die Tiere wurden *ad libitum* mit ssniff® R/M-Haltungsfutter (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und angesäuertem Wasser versorgt.

5.2.1 Virusinfektion und Sektionen

Die intranasale Infektion der Tiere erfolgte unter einer leichten Isofluran-Narkose mit 20 µl einer Virussuspension in EMEM. Kontrolltiere wurden mit EMEM scheininfiziert. Regelmäßig wurde das Allgemeinbefinden der Tiere entsprechend der in Tabelle 13 aufgeführten Kriterien eingeschätzt und das Körpergewicht bestimmt.

Tabelle 13: Bewertungsschema zur Einschätzung des Allgemeinbefindens der BALB/c-Mäuse.

Bewertung	Merkmale
0	keine optischen Veränderungen
1	struppiges Nackenhaar, keine Gewichtsabnahme
2	struppiges Nackenhaar, Gewichtsabnahme ≤ 1 g
3	struppiges Fell, beginnende Buckelausbildung, Gewichtsabnahme $\leq 1,5$ g
4	sehr struppiges Fell, deutlicher Buckel, Tier ist inaktiv, Gewichtsabnahme ≤ 2 g
5	Apathie, Tier sitzt isoliert von den anderen Tieren, struppig, mit starkem Buckel, teilweise geschlossene Augen, reduzierte Atmung, Gewichtsabnahme ≤ 3 g
6	Tier ist bewegungslos, Augen geschlossen, stark reduzierte Atmung, Gewichtsabnahme > 3 g
7	Tier ist verstorben

Für die aseptische Entnahme von Lunge (Histologie, RNA-Isolierung und Virustiterbestimmung) und Trachea (RNA-Isolierung und Virustiterbestimmung) wurden die Tiere mit Diethylether abgetötet und sowohl das Gesamtgewicht der Lunge als auch die Gewichte der für die RNA-Isolierung und Virustiterbestimmung vorgesehenen Organteile ermittelt. Entsprechend den Herstellerangaben konnten die Proben für eine spätere RNA-Isolierung durch Zugabe der RNA/ater[®] RNA Stabilization Solution konserviert werden. Die Organstückchen für die Virustiterbestimmung wurden bei -80 °C gelagert und das gewonnene Serum bei -20 °C aufbewahrt. Die Fixierung des großen linken Lungenflügels für die histologische Aufarbeitung erfolgte in einer 3,7%igen Formalin-Lösung.

5.2.2 Organaufarbeitung für Virustiterbestimmung

Die bei den Sektionen entnommenen Gewebestückchen wurden entsprechend ihres Gewichtes in einem 2 ml Reaktionsgefäß mit EMEM versetzt, so dass für die Lunge eine 10%ige und für die Trachea eine 2%ige Suspension entstand und mithilfe einer Edelstahlkugel (Qiagen, Hilden) in der Schwingmühle MM 300 (Retsch, Haan) zweimal für 1,5 min bei 30 Hz zerkleinert. Nach einminütiger Zentrifugation bei 3.000 rpm wurden die virushaltigen Überstände in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C gelagert. Die Bestimmung der Virustiter erfolgte mit der Endverdünnungsmethode nach Reed und Muench in MDCK-Zellen.

5.2.3 Hämagglutinationshemmtest

Die Möglichkeit eine Hämagglutinationsreaktion mit spezifischen Antikörpern zu hemmen kann zum quantitativen Nachweis dieser Antikörper (hämagglutinationsinhibierende Antikörper, HI-AK) genutzt werden.

Im Serum sind Agglutinine und Inhibitoren enthalten, die zu falsch-positiven Ergebnissen führen würden, da sie eine Hämagglutination verhindern. Die Eliminierung hitzelabiler Inhibitoren in 1 : 5 mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünntem Serum erfolgte für 30 min bei 56 °C.¹⁵⁸ Anschließend wurden 50 µl des hitzeinaktivierten Serums mit 50 µl einer 25%igen Kaolinlösung zur Eliminierung von β -Lipoprotein-Inhibitoren versetzt und für 20 min bei 4 °C unter mehrmaligem Mischen der Lösung inkubiert.¹⁵⁹ Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 7.000 rpm konnte der Überstand (\triangleq 1 : 10 Verdünnung des Originalserums) im Hämagglutinationshemmtest eingesetzt werden. Dafür wurde zunächst eine Serumverdünnungsreihe (Faktor 2) in 25 µl NaCl mit 25 µl einer 4 HAU enthaltenden Virussuspension versetzt und für 1 h bei 4 °C zur Reaktion gebracht. Nach Zugabe von 50 µl einer 1%igen Hühnererythrozytensuspension und einer weiteren Inkubationszeit von 1 h bei 4 °C erfolgte die visuelle Auswertung. Der Versuchsaufbau schloss folgende Kontrollen ein: i) positive Kontrolle der 4 HAU ohne Serum, ii) negative Hämagglutination der Erythrozyten und iii) Seren der nichtinfizierten Mäuse.

5.2.4 Histologie

Alle histologischen Arbeiten führte Frau Meißner (Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Universitätsklinikum Jena) durch. Die für mind. 24 h in 3,7%igem Formalin fixierten Organstückchen wurden mit dem Gewebeeinbettautomat Shandon Citadel® 1000 in einer ansteigenden Alkoholreihe entwässert und am Shandon Histocentre™ 2 (beides Thermo Fisher Scientific, Dreieich) in Shandon Histoplast Paraffin eingebettet. Anschließend konnten die Gewebeblöcke am Schlittenmikrotom Leica SM2000 R (Leica Microsystems, Nussloch) in 6 µm dünne Scheiben geschnitten und auf Objektträger aufgetragen werden. Die Präparate wurden bei 37 °C luftgetrocknet und durch eine absteigende Alkoholreihe (Xylol 2 x 5 min, 100%iges Ethanol 2 x 3 min, 70%iges Ethanol 2 x 3 min, 50%iges Ethanol 3 min und Aqua dest. 2 x 3 min) entparaffiniert, mit Hämatoxylin-Eosin (HE) entsprechend Standardprotokollen für histopathologische Untersuchungen gefärbt und mit Shandon Hypermount™ dauerhaft eingebettet.

Bei der lichtmikroskopischen Auswertung der Präparate erfolgte die Einschätzung hinsichtlich der virusinduzierten Veränderungen nach dem in Tabelle 14 aufgezeigten Schema.

Tabelle 14: Bewertungsschema für die lichtmikroskopische Einschätzung HE-gefärbter Lungenpräparate.

Bewertung	Merkmale
0	keine histologischen Veränderungen
1	Veränderungen in ≤ 25 % des Gewebeschnitts
2	Veränderungen in ≤ 50 % des Gewebeschnitts
3	Veränderungen in ≤ 75 % des Gewebeschnitts
4	Veränderungen in > 75 % des Gewebeschnitts

5.2.5 Nachweis viraler RNA mittels *In situ*-Hybridisierung

Den Nachweis viraler RNA in 6 μm dünnen Lungengewebschnitten führte Frau Prof. Klingel (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen) durch.¹⁶⁰ Die RNA-Detektion erfolgte mit einzelsträngigen ^{35}S -markierten RNA-Proben, die mithilfe eines pBluescript KS+ Vektors synthetisiert wurden, welcher die Nukleotide 1077 – 1442 des NP-Genes von A/FPV/Rostock/24 (H7N1) enthielt.¹⁶¹ Nach dreiwöchiger Autoradiografie bei 4 °C wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin gegengefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet.

5.2.6 Antivirale Behandlung mit Oseltamivir-Phosphat *in vivo*

Die antivirale Therapie mit Oseltamivir-Phosphat (gelöst in NaCl) begann 4 h vor der Virusinfektion. Dabei wurden die Tiere über einen Zeitraum von 5 bzw. 7 Tagen zweimal täglich mit der Substanz in einer Konzentration von 10 mg/kg Körpergewicht/Tag oral behandelt. Scheininfizierte Kontrolltiere sowie placebobehandelte Mäuse bekamen entsprechend dieses Schemas NaCl oral verabreicht. Die intranasale Infektion sowie der weitere Versuchsablauf erfolgten wie zuvor beschrieben.

5.3 Antivirale Wirksamkeit von Tamiflu® im Schwein

Der von Herrn Dr. Dürrwald (IDT Biologika GmbH Dessau-Roßlau) durchgeführte Versuch zur antiviralen Wirksamkeit von Oseltamivir-Phosphat in seiner Handelsform als Hartkapseln zum Einnehmen für die humane Anwendung (Handelsname: Tamiflu®) gegen A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2) ermöglichte den Vergleich der Therapierbarkeit dieses Isolates im natürlichen Wirt und in der Maus.

Derzeit stellt die Vakzinierung die sicherste Methode zur Vorbeugung einer Influenzainfektion dar. Der von der IDT Biologika GmbH entwickelte trivalente

Schweineimpfstoff RESPIPORC FLU3 konnte als Vergleich für die Oseltamivirtherapie parallel an einer Gruppe Schweine eingesetzt werden. Vor Versuchsbeginn wurden insgesamt 32 seronegative Schweine in drei Gruppen eingeteilt. Die zehn Tiere der Gruppe 1 (FLU3) bekamen im Alter von sieben und zehn Wochen jeweils eine 2 ml Einzeldosis des Impfstoffs (Batch 0050806) intramuskulär hinter das rechte bzw. linke Ohr gespritzt. Gruppe 2 (Tamiflu®) bestand ebenfalls aus zehn Schweinen und bekam analog der Tamiflu®-Packungsbeilage für die humane Anwendung die Hartkapseln oral verabreicht. Die Behandlung begann am Abend vor der Infektion mit der Gabe von zwei Kapseln (= 150 mg) pro Tier und wurde über eine Dauer von vier Tagen mit jeweils einer Kapsel (= 75 mg) morgens und abends fortgesetzt. Gruppe 3 (zwölf Tiere, Placebo) blieb unbehandelt und ungeimpft und diente als positive Viruskontrolle. Alle Tiere wurden im Alter von elf Wochen durch 30-minütige Vernebelung einer A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2)-Virussuspension mit dem Aerosolgenerator SAG-1 infiziert. Die Schweine waren den unter Druckluftzufuhr generierten Aerosolen mit einer Tröpfchengröße von 0,5 – 20 µm über einen Zeitraum von 2 h ausgesetzt. Bei dieser Methode erreichen Tröpfchen von 2 – 5 µm die Alveolen der Tiere, kleinere Tröpfchen werden wieder ausgeatmet und größere lagern sich in den Bronchien ab. Dieses Modell imitiert damit weitgehend natürliche Vorgänge.

Tabelle 15: Bewertungsschema zur Einschätzung der respiratorischen Symptome virusinfizierter Schweine.

Bewertung	Merkmale
0	keine Veränderung in der Atmung
0,5	Atmung leicht frequentiert
1	frequente Atmung
2	heftige Atmung
3	Respiration schwer beeinflusst, pumpende Atembewegungen, Apathie

An den Tagen 1 bis 3 p. i. morgens und abends und danach täglich erfolgte die Einschätzung der Tiere bezüglich respiratorischer Symptome (Tabelle 15) sowie die Bestimmung der Rektaltemperatur und des Körpergewichts.

Bei den Sektionen am Tag 2 und zu Versuchende am Tag 10 p. i. wurden die Lunge und Trachea für histologische Untersuchungen und dem Virustiternachweis entnommen. Für die Histologie erfolgte die Fixierung der Organstückchen von jedem Lungenflügel sowie der Trachea in 10%igem Formalin. Gewebeproben der rechten und linken Lungen- und Trachealseite wurden bei der IDT Biologika GmbH aufgearbeitet und die Virustiter in den

Homogenisaten durch Bestimmung der 50%igen Eiinfektionsdosis pro 10 mg Organgewicht ($EID_{50}/10\text{ mg}$) ermittelt.

Zusätzlich wurden täglich Nasenabstriche gewonnen. Zur Virusisolation kamen die Nasentupfer direkt nach der Entnahme in Zellkulturmedium mit DSG 72, Gentamycin und Amphotericin B und lagerten bis zur Bestimmung der Virustiter mit der Endverdünnungsmethode nach Reed und Muench in MDCK-Zellen am Institut für Virologie und Antivirale Therapie Jena bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.4 Immunhistochemische Nachweismethoden

5.4.1 Nachweis des viralen Nukleoproteins

Bei der verwendeten APAAP (Alkalische Phosphatase-anti Alkalische Phosphatase)-Methode erfolgt ein Antigennachweis über die Bildung unlöslicher Enzym-Immunkomplexe. Dazu werden die Antigene mit einem spezifischen Primärantikörper aus der Maus detektiert. Der Sekundärantikörper (Brückenantikörper, Kaninchen-anti-Maus-IgG) verbindet anschließend den Primärantikörper mit dem APAAP-Komplex, welcher sich aus zwei Molekülen Alkalischer Phosphatase und einem dagegen gerichteten Antikörper aufbaut. Das Enzym hydrolysiert die im Substrat enthaltenen Naphtholphosphatester zu Phenolkomponenten und Phosphaten. Die Phenole reagieren mit farblosen Diazoniumsalzen (Chromogene) und bilden so unlösliche Azofarbstoffe.

Für die Färbungen wurde das Dako REAL™ Detection System APAAP Mouse verwendet. Dem fünfminütigen Waschen der Proben mit TBS schloss sich ein Blockierungsschritt mit TBS + 1 % RSA für 20 min an. Nach 30-minütiger Inkubation des Primärantikörpers (monoclonal mouse anti-Influenza A nucleoprotein; 1 : 400 in TBS + 1 % RSA) wurden die Proben 3 x 2 min mit TBS + 0,05 % Saponin gewaschen und der im Testkit enthaltene Brückenantikörper für weitere 30 min aufgegeben. Dem dreimaligen Waschen mit TBS + 0,05 % Saponin folgte eine einstündige Inkubation mit dem APAAP-Komplex. Anschließend wurden die Proben 3 x 2 min mit TBS gespült und spezifische Antikörperbindungen mit Chromogen-Substrat für 10 – 20 min detektiert und lichtmikroskopisch ausgewertet.

5.4.2 Ziliennachweis

Der spezifische Nachweis von Zilien auf ausdifferenzierten NHBE-Zellen und entparaffinierten Gewebeschnitten wurde entsprechend Literaturangaben⁴¹ durchgeführt. Dem fünfminütigen Waschen mit TBS folgte eine Permeabelisierung mit TBS + 0,2 % Triton-X100 für 5 min. Vor der Inkubation mit dem monoklonalen Maus anti- β -Tubulin IV

Antikörper (1 : 400 TBS + 1 % RSA) bei 4 °C über Nacht wurden die Proben 2 x 5 min mit TBS gewaschen und 20 min mit TBS + 1 % RSA blockiert. Intensives Waschen mit TBS + 0,05 % Saponin für 3 x 5 min am Folgetag entfernte überschüssigen, nichtgebundenen Antikörper. Anschließend wurde der Peroxidase-markierte Sekundärantikörper (Goat anti-mouse IgG Peroxidase Conjugate; 1 : 250 in TBS) für 30 min aufgetragen, die Proben 3 x 5 min mit TBS gewaschen und mit dem NOVADetect DAB Substrate System für 10 – 15 min gefärbt. Die Auswertung der Färbung erfolgte lichtmikroskopisch.

5.4.3 Detektion spezifischer Sialinsäurereste auf Zellen

Zum spezifischen Nachweis α 2,3- und α 2,6-verknüpfter Sialinsäurereste auf Zellen werden die Eigenschaften von Lektinen, spezifisch an Sialinsäurereste auf den Zelloberflächen zu binden, ausgenutzt. Für den Nachweis wurden die beiden im DIG Glycan Differentiation Kit der Firma Roche Diagnostics enthaltenen Digoxigenin-markierten Lektine SNA und MAA verwendet und die Färbungen entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Das aus *Sambucus nigra* isolierte SNA bindet spezifisch α 2,6-verknüpfte Sialinsäurereste während MAA, isoliert aus *Maackia amurensis*, an α 2,3-verknüpfte Sialinsäurereste bindet.

Dem 30-minütigen Blockierungsschritt mit der im Testsystem enthaltenen Blockierungslösung (1 : 10 in TBS) folgen intensives Waschen (2 x 10 min TBS, 1 x 10 min FACS-Puffer) und im Falle der untersuchten Zelllinien eine einstündige Lektininkubation mit 1 μ l SNA, 5 μ l MAA bzw. ohne die Lektine in 1 ml FACS-Puffer. Bei den entparaffinierten Gewebeschnitten bedurfte es einer Lektininkubation über Nacht bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Proben erneut für 3 x 10 min mit TBS gewaschen um nichtgebundene Lektine zu entfernen, bevor die Ansätze mit Alkalische Phosphatase-markierten anti-Digoxigenin-Antikörper (1 : 1.000 in TBS) für 1 h zur Reaktion gebracht wurden. Nach dreimaligem Waschen der Proben mit TBS für je 10 min erfolgte die Detektion spezifisch gebundener Lektine mit NBT/BCIP-Substratlösung in Puffer 2. Bei dieser Methode wird innerhalb weniger Minuten das 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) in Verbindung mit Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) zu einem violetten bis blauen Farbstoff umgesetzt, indem das Tetrazoliumsalz das Indoxyl oxidiert.

Zur Abklärung in der Literatur beschriebener Unterschiede zwischen den Lektinen verschiedener Hersteller¹⁶² erfolgten Vergleichsfärbungen mit den biotinylierten Lektinen SNA, MAA-I sowie MAA-II der Firma Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA) entsprechend Literaturangaben¹⁶³ auf mit eiskaltem Methanol für 10 min fixierten konfluenten Zellen bzw. entparaffinierten Organschnitten. Die Streptavidin-Biotin-Färbung nutzt die starke Affinität von Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) für das Vitamin Biotin zur

Kopplung von enzymmarkiertem Streptavidin an biotinylierte Sekundärantikörper (= labeled Streptavidin-Biotin [LSAB]-Methode). Für die Färbungen wurde das NOVADetect Large Volume Detection System Anti-Rabbit verwendet, bei dem das Streptavidin Alkalische Phosphatase-gekoppelt ist.

Nach einstündiger Blockierung der Proben mit PBS + 1 % RSA erfolgte die Lektininkubation (10 µg/ml MAA-I bzw. MAA-II und 1 µg/ml SNA) bei 4 °C über Nacht. Nichtgebundene Lektine wurden durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die spezifische Bindung der Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Lösung an die biotinylierten Lektine (Inkubationszeit 10 min), gefolgt von 3 x 10 min Waschen mit TBS und Färbung mit NBT/BCIP-Substratlösung ermöglichte die Detektion der Sialinsäurereste.

5.5 FACS-Analysen zur Quantifizierung spezifischer Sialinsäurereste auf Zellen

FACS-Analysen wurden entsprechend Literaturangaben¹⁶⁴ unter Verwendung der Lektine des DIG Glycan Differentiation Kits durchgeführt. ~ 2 x 10⁶ Zellen/ml in drei parallelen Ansätzen mit 1 µl SNA, 5 µl MAA bzw. ohne die Lektine in FACS-Puffer kamen für 1 h bei Raumtemperatur zur Reaktion. Dem zweimaligen Waschen mit PBS schlossen sich jeweils 15-minütige Inkubationsschritte mit monoklonalem Maus anti-Digoxigenin-Antikörper (1 : 50 in PBS) und FITC-markiertem polyklonalem Kaninchen bzw. Schaf anti-Maus Immunoglobulin (1 : 60 in PBS) an. Zwischen diesen Schritten und danach wurden die Proben jeweils zweimal mit PBS gewaschen. Nach Resuspension der Zellen in 1 ml PBS erfolgte die Analyse der Proben am BD LSR II (BD Biosciences, Heidelberg) mit Unterstützung von Herrn Dr. Dahse am Leibnitz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V. – Hans-Knöll-Institut Jena.

5.6 Methoden für molekularbiologische Arbeiten

5.6.1 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

RNA-Isolierung aus Zellen und virushaltigen Flüssigkeiten

Nach Auftreten des zytopathischen Effektes wurden virusinfizierte Zellkulturen auf 6 cm-Petrischalen bzw. der virushaltige Zellkulturüberstand mit 350 µl Lyse-Puffer RLT, versetzt mit 10 µg/ml 2-Mercaptoethanol, lysiert und die RNA nach Herstellerangaben mit dem RNeasy® Mini Kit präpariert.

Die Bestimmung der RNA-Ausbeute erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm am NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA).

Eine Absorption bei 260 nm (A_{260}) von 1 entspricht dabei einem RNA-Gehalt von 40 µg/ml. Der Reinheitsgrad der isolierten RNA lässt sich aus dem Quotienten der gemessenen Absorptionen bei 260 und 280 nm ablesen. Reine RNA hat ein A_{260}/A_{280} -Verhältnis von 1,9 – 2,1. Bei Protein- und Phenolverunreinigungen liegt der Quotient unter 1,9 und bei zu hohen Salzkonzentrationen ist der Wert größer als 2,1.

RNA-Isolierung aus Organen

Mit der TRI Reagent[®] Solution erfolgte die RNA-Isolierung aus dem direkt bei der Organentnahme mit RNAlater[®] RNA Stabilization Solution behandelten Lungengewebe. Dafür wurden die Proben entsprechend ihres Gewichtes mit der TRI Reagent[®] Solution in 2 ml Reaktionsgefäßen versetzt (500 µl bis 50 mg bzw. 1.000 µl bis 100 mg Organ) und mithilfe einer 5 mm Edelstahlkugel (Qiagen, Hilden) in der Schwingmühle MM 300 (Retsch, Haan) für 2 x 1 min bei 30 Hz homogenisiert und die RNA-Isolierung entsprechend dem Herstellerprotokoll fortgesetzt. Die Konzentration der in DEPC-behandeltem Wasser gelösten RNA konnte am NanoDrop[™] 1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) bestimmt werden. Da die Reinheit und Qualität der RNA von der Isolierungsmethode anhängt, sollte bei diesem System das A_{260}/A_{280} -Verhältnis zwischen 1,8 und 2,2 liegen.

cDNA-Synthese

Mithilfe des Omniscript[®] RT Kits und der Primer oligo dT bzw. Uni12 erfolgte die Umschreibung der RNA in cDNA. Für die Reverse Transkription wurden 1,5 µg der isolierten RNA in einem Endvolumen von 10 µl eingesetzt. Der Reaktionsansatz bestehend aus x µl RNA, 7 - x µl RNase-freies Wasser, 1 µl 10x Puffer RT, 1 µl dNTP (5 mM), 0,5 µl Primer (20 µM) und 0,5 µl Omniscript RT (4 U/µl) kam für 60 min bei 37 °C im Mastercycler[®] gradient (Eppendorf, Hamburg) zur Reaktion, gefolgt von einem fünfminütigen Denaturierungsschritt bei 93 °C. Die cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

5.6.2 Polymerasekettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) können *in vitro* selektiv Nukleinsäuren definierter Länge und Sequenz vermehrt und angereichert werden. Sie wurde 1983 von Karry B. Mullis etabliert.¹⁶⁵ Unter Verwendung virusspezifischer Primer und einer hitzestabilen Polymerase werden gewünschte DNA-Fragmente durch eine zyklische Wiederholung der benötigten Reaktionsschritte (DNA-Denaturierung, Primer-Annealing und DNA-Polymerisation) amplifiziert. Dabei hängen die einzelnen Parameter von den verwendeten Primern und der Fragmentlänge ab.

Alle PCR-Ansätze wurden auf Eis in 0,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert und im Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburg) unter den entsprechenden Bedingungen zur Reaktion gebracht.

Amplifikation von housekeeping-Genen

Bei *housekeeping*-Genen handelt es sich um Gene, die unabhängig vom Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert werden. Mit dem molekularbiologischen Nachweis dieser Gene mithilfe des HotStar® Taq DNA Polymerase Kits konnte die Qualität und Konzentration der cDNA überprüft werden. Dafür wurden 14,875 µl Aqua bidest., 5 µl 5x Q-Solution, 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 0,5 µl dNTP Mix (10 mM; MP Biomedicals, Heidelberg), je 0,5 µl Primer sense und antisense (10 µM) sowie 0,125 µl HotStar Taq® DNA Polymerase (5 U/µl) zusammen mit 1 µl cDNA (oligo dT) bei den in Tabelle 16 zusammengefassten Bedingungen im Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburg) zur Reaktion gebracht.

Tabelle 16: PCR-Bedingungen für die Amplifikation von *housekeeping*-Genen.

Reaktionsschritt	GAP-DH	murines β -Aktin
1. Denaturierung	15 min bei 95 °C	15 min bei 95 °C
2. Zyklen	30	28
Denaturierung	60 sec bei 96 °C	60 sec bei 94 °C
Primer-Annealing	30 sec bei 56 °C	30 sec bei 56 °C
DNA-Polymerisation	45 sec bei 72 °C	50 sec bei 72 °C
3. DNA-Polymerisation	7 min bei 72 °C	7 min bei 72 °C

Amplifikation von Influenza-A-Genomsegmenten

Die Genomsegmente 4 (HA), 6 (NA) und 7 (M) wurden mit dem Q-BioTaq CORE Kit 10 unter Verwendung universeller Primer¹⁵¹ in Kombination mit fragmentspezifischen Primern (Tabelle 7) amplifiziert. 38,75 µl DEPC-Wasser, 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 5 µl 10x PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl₂, je 2 µl Primer sense und antisense (10 µM) sowie 0,25 µl Q-BioTaq (5 U/µl) kamen zusammen mit 1 µl cDNA (Uni12) unter den folgenden Bedingungen im Mastercycler® gradient (Eppendorf, Hamburg) zur Reaktion:

Denaturierung:	5 min bei 94 °C
38 Zyklen:	Denaturierung: 30 sec bei 94 °C
	Primer-Annealing: 50 sec bei 55 °C
	DNA-Polymerisation: 60 sec bei 72 °C
3. DNA-Polymerisierung:	10 min bei 72 °C

Agarose-Gelelektrophorese

Ein Gemisch von DNA-Molekülen unterschiedlicher Längen lässt sich mittels Gelelektrophorese auftrennen. Die negativ geladenen DNA-Fragmente wandern zur Anode eines elektrischen Feldes. Dabei wird die Laufgeschwindigkeit einerseits durch die von der Agarosekonzentration abhängige Porengröße des Gels und andererseits von der Länge der DNA-Fragmente beeinflusst.

Zur exakten Auftrennung der PCR-Produkte wurden 1,2%ige Agarosegele verwendet, die Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml enthielten. Die Auftrennung der mit 1/5 Volumen DNA-Ladepuffer versetzten Proben erfolgte mit einer Laufzeit von 1 h bei 5 V/cm in 1x TBE-Puffer. Anschließend konnten die amplifizierten DNA-Banden am Geldokumentationssystem E.A.S.Y.[®] Win32 (Herolab, Wiesloch) mittels UV-Licht sichtbar gemacht und ausgewertet werden.

5.6.3 Reinigung der PCR-Produkte und Sequenzierung

In Vorbereitung der Sequenzierreaktion mussten die amplifizierten PCR-Fragmente von Proteinverunreinigungen, Pufferrückständen sowie Primern gereinigt werden, die andernfalls zu einer Beeinträchtigung der nachfolgenden Reaktionen führen würden.

Reine PCR-Fragmente wurden direkt mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt und bei -20 °C aufbewahrt. Ergab die PCR ein Gemisch aus Fragmenten unterschiedlicher Größen, so mussten diese in einer Gelelektrophorese aufgetrennt, die gewünschten Banden ausgeschnitten und mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt werden.

Die Sequenzierung der Influenza-A-Genomsegmente erfolgte mit der Kettenabbruch-Methode nach Sanger¹⁶⁶ mit dem GenomeLab[™] DTCS Quick Start Kit. Entsprechend der Bandenstärke auf einem PCR-Übersichtsgel wurden maximal 7 µl aufgereinigtes PCR-Produkt mit 2 µl Quick Start Mix und 1 µl Primer (5 µM) im Mastercycler[®] gradient (Eppendorf, Hamburg) zur Reaktion gebracht. Die Amplifikation erfolgte in 30 Zyklen mit der Denaturierung für 20 sec bei 96 °C, dem Primer-Annealing für 50 sec bei 55 °C und der DNA-Polymerisation für 3 min bei 60 °C. Anschließend mussten die Proben mit 2 µl 100 mM Natrium-EDTA; pH 8,0, 2 µl 3 M Natriumacetat; pH 5,2, 1 µl Glykogen und 60 µl 100%igen Ethanol entsprechend den Herstellerangaben aufgereinigt werden, bevor sie im Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg) bei 30 °C für 10 min getrocknet, das Pellet in 30 µl GenomeLab[™] Sample Loading Solution gelöst und im CEQ[™] 8000 Genetic Analysis System (Beckman Coulter, Krefeld) sequenziert wurden.

Alle erhaltenen Nukleinsäuresequenzen wurden manuell im Programm BioLign Version 4.0.6.2¹⁶⁷ ausgewertet, in AS-Sequenzen umgeschrieben und mittels ClustalW-Alignment

miteinander verglichen. Unter Verwendung des Programms Mega 4.0¹⁶⁸ konnten phylogenetische Stammbäume mit der Neighbor Joining Methode basierend auf den JTT Substitutionsmodell¹⁶⁹ und 1.000 Replikationen generiert werden.

5.7 Statistische Auswertungen

Die in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Auswertungen erfolgen mit dem Programm SigmaStat 3.1.

Zur Ermittlung der mittleren NAI-Empfindlichkeit humaner und porciner FLUAV im NA-Hemmtest wurden Box Plot-Analysen durchgeführt. Entsprechend einer Publikation des *Centers of Disease Control and Prevention* (CDC)¹⁷⁰ werden Werte, die mehr als drei Standardabweichungen von der mittleren IC₅₀ entfernt liegen als milde Ausreißer definiert und gehen in die statistischen Auswertungen ein. Werte, die um mehr als das 10fache der mittleren IC₅₀ erhöht sind identifizierten extreme Ausreißer, welche von allen statistischen Analysen ausgeschlossen werden.

Signifikante Unterschiede im Körpergewicht, bei den Virustitern, den rektalen Körpertemperaturen sowie den HI-AK-Titern zwischen substanz- und placebobehandelten Tieren *in vivo* wurden mithilfe eines einseitigen Zweistichproben t-Test ermittelt.¹⁷¹ Die Analysen des Allgemeinbefindens und der histopathologischen Untersuchungen der Lungenproben erfolgten mit dem Mann-Whitney-U-Test. Signifikanzen in den Überlebensraten wurden im Fisher Exact Test untersucht.

6 Ergebnisse

6.1 Virustatikaempfindlichkeit porziner und humaner Influenza-A-Viren *in vitro*

In der vorliegenden Dissertation sollte die Empfindlichkeit von FLUAV der Subtypen H1N1 und H1N2 gegenüber Amantadin und den beiden NAI Oseltamivir und Zanamivir verglichen werden. Insgesamt standen 74 H1N1- (46 swFLUAV und 25 huFLUAV) und 34 H1N2-Isolate (28 swFLUAV und sechs huFLUAV), die zwischen 1981 und 2006 in Deutschland bei Menschen bzw. Schweinen isoliert wurden, zur Verfügung. Nach Vermehrung und Titration der Viren auf MDCK-Zellen wurden ihre hämagglutinierenden Eigenschaften gegenüber Hühnererythrozyten bei 4 °C und 37 °C bestimmt (Tabellen 3 – 6) und die antiviralen Tests durchgeführt.

Das H1N1-Isolat A/swine/Belzig/2/01 stellte zum einen Frau Dr. Schrader (Bundesinstitut für Risikobewertung, Berlin) und zum anderen Herr Dr. Dürrwald (IDT Biologika GmbH, Dessau-Roßlau) zur Verfügung. Zur besseren Unterscheidung der beiden Stämme werden sie im Folgenden als A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ bzw. -„Dessau“ entsprechend ihrer Herkunft bezeichnet. Das Isolat wurde an den beiden Einrichtungen auf unterschiedliche Weise passagiert. Zunächst erfolgte in beiden Fällen die Anzucht maximal zweimal über das embryonierte Hühnerei. Anschließend wurde A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ einmal über MDCK-Zellen und A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“ über MDBK-Zellen vermehrt. Vergleichende Analysen zum Phänotyp der beiden Isolate ergaben Unterschiede im Hämagglutinationsverhalten dieser beiden Viren bei 4 bzw. 37 °C (Tabelle 3). Während es bei A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ einen Wechsel von vollständiger Hämagglutination bei 4 °C auf keine Hämagglutination bei 37 °C gab, war bei A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“ eine gute Hämagglutination bei beiden Temperaturen zu verzeichnen. Weitere Unterschiede konnten im Replikationsverhalten der Isolate auf verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 3). Dazu erfolgte die Infektion von MDBK-, MDCK- sowie ausdifferenzierten NHBE-Zellen mit einer MOI von 0,1 TCID₅₀/Zelle für 1 h gefolgt von dreimaligem Waschen mit EMEM um ungebundenes Virus zu entfernen. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Virustiter mittels Titration auf MDCK-Zellen bestimmt. Ein signifikanter Unterschied im Replikationsverhalten der beiden Isolate war vor allem in MDBK-Zellen zu verzeichnen ($p < 0,05$). In dieser Zelllinie erreichte A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“ 2,4 Logstufen höhere Titer. In NHBE-Zellen betrug der Unterschied zwischen den Virusstämmen maximal 1 Logstufe.

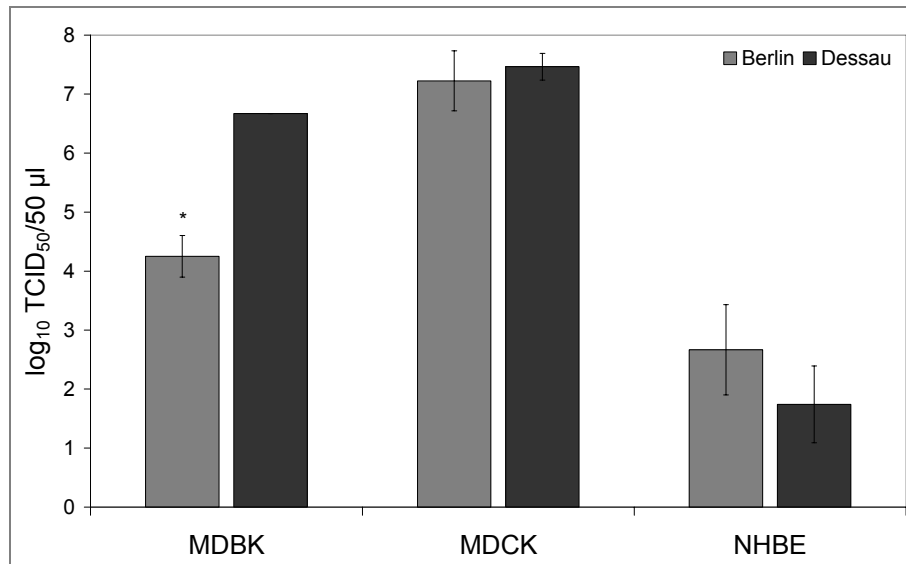


Abbildung 3: Wachstum von A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ und -„Dessau“ in MDBK-, MDCK- und ausdifferenzierten NHBE-Zellen. Die Virustiter wurden 24 h nach der Infektion mit einer MOI von 0,1 TCID₅₀/Zelle mittels Titration auf MDCK-Zellen bestimmt. * p < 0,05.

In den antiviralen *In vitro*-Untersuchungen kamen sowohl zellkulturbasierte (alle drei Substanzen) als auch ein enzymbasierter Test (NAI) zum Einsatz. Des Weiteren wurden die erhaltenen *In vitro*-Ergebnisse (Phänotyp) mit den Sequenzen der für die Oberflächenproteine HA und NA sowie das integrale Membranprotein M2 kodierenden Genomsegmente genotypisch überprüft. Im Rahmen einer Kooperation im BMBF-geförderten *FluResearchNet* wurden die Genomsegmente der swFLUAV von Herrn Prof. Dr. Zell und dessen Arbeitsgruppe (Institut für Virologie und Antivirale Therapie, Universitätsklinikum Jena) sequenziert und für die Analysen zur Verfügung gestellt.

6.1.1 Empfindlichkeit der Influenza-A-Viren gegenüber Amantadin

Das Genomsegment 7 kodiert für das Matrixprotein M1 und das integrale Membranprotein M2 mit Ionenkanalfunktion. Ein direkter Zusammenhang zwischen Substitutionen in der Transmembrandomäne des M2-Proteins an den AS 26, 27, 30, 31 und 34 und der Amantadinresistenz ist in der Literatur beschrieben.^{100, 105} Dass diese AS-Austausche die Resistenz hervorrufen und Ergebnisse von phänotypischen und genotypischen Untersuchungen zur Amantadin-Empfindlichkeit von FLUAV komplett übereinstimmen, ist durch Reverse Genetik bestätigt worden.¹⁰⁶ Aus diesem Grund erfolgte die Bestimmung der Amantadinempfindlichkeit der Viren zunächst mittels Genotypisierung.

Die Sequenzanalyse des M-Genomsegments der porzinen H1N1- und H1N2-Isolate sowie von Viren des Subtyps H3N2 ergab für alle Viren die nach 1989 isoliert wurden die

Ergebnisse

Substitution S31N im M2-Protein (Daten nicht dargestellt, Datenbanknummern EU478795 – EU478849), welche auf eine generelle Amantadinresistenz der Stämme hinweist.^{172, 173}

Zusätzlich exprimierten acht swH1N1-Isolate (A/swine/Schwerin/103/89, A/swine/Bakum/5/95, A/swine/Haselünne/IDT2617/03, A/swine/Vechta/IDT2653/03, A/swine/Laer/IDT3893/05, A/swine/Wohlerst/IDT4093/05, A/swine/Voglarn/IDT4096/05 und A/swine/Kroegel/IDT4192/05) die V27A-Substitution.

Bei den huFLUAV konnten durch die Genotypisierung keine Mutationen im M2-Protein nachgewiesen werden, die auf eine Amantadinresistenz der Isolate hinweisen (Datenbanknummern EU249148 – EU249178).¹¹⁶

Der Phänotyp der anhand der M2-Proteinsequenzen ermittelten Amantadinempfindlichkeit wurde für ausgewählte Isolate im Plaquereduktionstest mit Amantadin in MDCK-Zellen überprüft. Die in drei unabhängigen Testen mit 2 – 3 Parallelen ermittelten IC₅₀-Werte sind in Tabelle 17 aufgezeigt.¹⁷³

Tabelle 17: Amantadinempfindlichkeit ausgewählter porziner und humaner Influenza-A-Viren vom Subtyp H1N1 und H1N2 im Plaquereduktionstest in MDCK-Zellen.

FLUAV	Subtyp	IC ₅₀ Amantadin [µM]
sw/Potsdam/1/81	H1N1	0,05
sw/Potsdam/15/81	H1N1	0,27
sw/Schwerin/103/89 ^{S31N, V27A}	H1N1	> 133
sw/Bakum/5/95 ^{S31N, V27A}	H1N1	26,6
sw/Belzig/2/01 ^{S31N}	H1N1	> 133
sw/Wedel/IDT2965/04 ^{S31N}	H1N1	> 53
sw/Kroegel/IDT4192/05 ^{S31N, V27A}	H1N1	> 53
sw/Laer/IDT3893/05 ^{S31N, V27A}	H1N1	> 53
sw/Voglarn/IDT4096/05 ^{S31N, V27A}	H1N1	> 53
sw/Wohlerst/IDT4093/05 ^{S31N, V27A}	H1N1	> 53
sw/Bakum/1832/00 ^{S31N}	H1N2	> 133
sw/Bakum/1833/00 ^{S31N}	H1N2	> 133
sw/Gescher/IDT2702/03 ^{S31N}	H1N2	> 53
sw/Löningen/IDT2530/03 ^{S31N}	H1N2	> 53
sw/Gudensberg/IDT2930/04 ^{S31N}	H1N2	> 53
sw/Nortrup/IDT3685/04 ^{S31N}	H1N2	> 53
sw/Stolzenau/IDT3296/04 ^{S31N}	H1N2	> 53
sw/Dötlingen/IDT3780/05 ^{S31N}	H1N2	> 53

Fortsetzung Tabelle 17

FLUAV	Subtyp	IC ₅₀ Amantadin [µM]
Bayern/7/95	H1N1	0,48
Berlin/60/05	H1N1	0,21
Bremen/4/05	H1N1	0,32
Baden-Württemberg/20/03	H1N2	0,21
Rheinland-Pfalz/34/03	H1N2	0,21

Während die beiden swH1N1-Isolate A/swine/Potsdam/1/81 und A/swine/Potsdam/15/81 mit IC₅₀-Werten von 0,05 bzw. 0,27 µM Amantadin-sensitiv waren, erwiesen sich alle anderen untersuchten swFLUAV mit IC₅₀-Werten von 26,6 bis > 133 µM als Amantadin-resistent. Die für die humanen Viren erhaltenen Ergebnisse belegten mit einer mittleren 50%igen Hemmdosis von 0,27 ± 0,11 µM Amantadin eine gute Empfindlichkeit für alle Isolate. Diese Ergebnisse korrelieren mit den genotypischen Befunden.

6.1.2 Wirkung von Oseltamivir und Zanamivir gegenüber den Influenza-A-Viren

Zur Untersuchung der *In vitro*-Empfindlichkeit von FLUAV gegenüber den NA-Hemmern finden in der Literatur sowohl der enzymbasierte NA-Hemmtest als auch zellkulturbasierte Testsysteme Anwendung. Mit dem NA-Hemmtest kann direkt die NAI-Empfindlichkeit des viralen Glykoproteins bestimmt werden. Für die Untersuchungen sind sowohl fluoreszenz-¹⁷⁴ als auch chemilumineszenzbasierte¹⁷⁵ Testsysteme etabliert. In vom *Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network* durchgeführten Vergleichsstudien erwiesen sich beide Methoden als geeignet zur Analyse der NA-Aktivität und zur Detektion resistenter Isolate.^{124, 176} Ein bedeutender Vorteil der chemilumineszenzbasierten Analyse liegt in der bis zu 67fach höheren Sensitivität im Vergleich zur fluoreszenzbasierten Methode, wodurch auch klinische Isolate mit niedriger NA-Aktivität untersucht werden können.^{175, 176} Aus diesem Grund nutzt das *Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network* standardmäßig das chemilumineszenzbasierte Testsystem zur Bestimmung der NAI-Empfindlichkeit.¹⁷⁶

Chemilumineszenzbasierter Neuraminidasehemmtest

Da mit dem NA-Hemmtest relativ schnell und einfach die Empfindlichkeit des viralen Oberflächenproteins gegenüber NA-Hemmern bestimmt werden kann, wurde der Test mit allen 31 huFLUAV und 74 swFLUAV durchgeführt. Als porzine Vergleichsstämme dienten je zwei europäische H1N1- (A/swine/Gent/V230/92, A/swine/Feldbach Austria/IDT5625/05) und H1N2-Isolate (A/swine/England/17394/96, A/swine/Gent7625/99). Für die Analyse der huFLUAV standen drei ältere H1N1-Isolate (A/Puerto Rico/8/34, A/Bayern/7/95, A/New Caledonia/20/99) aber keine H1N2-Viren als Referenzen zur Verfügung. Die statistischen Analysen wurden entsprechend den Empfehlungen einer großen weltweiten Studie des CDC¹⁷⁰ durchgeführt (siehe Punkt 5.7). Die Box Plot-Analysen der aus drei bis vier Bestimmungen ermittelten IC_{50} -Werte für Oseltamivir und Zanamivir sind in Abbildung 4 dargestellt und die durch horizontale Linien in den Boxen präsentierten Median-Werte für Oseltamivir und Zanamivir in Tabelle 18 zusammengefasst.

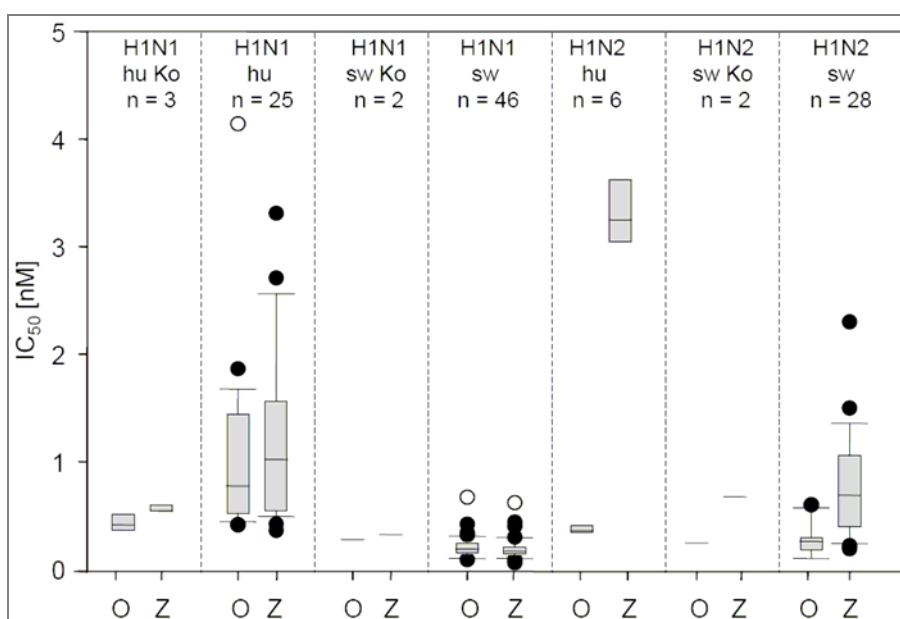


Abbildung 4: Box Plot-Analysen der im chemilumineszenzbasierten Neuraminidasehemmtest ermittelten IC_{50} -Werte [nM] für Oseltamivir (O) und Zanamivir (Z). Dargestellt sind die für die H1N1-Kontrollviren (hu Ko: A/Puerto Rico/8/34, A/Bayern/7/95 und A/New Caledonia/20/99; sw Ko: A/swine/Gent/V230/92, A/swine/Feldbach Austria/IDT5625/06) erhaltenen Daten im Vergleich zu den humanen und porzinen H1N1-FLUAV sowie die für die humanen H1N2-Viren ermittelten Werte und die Ergebnisse der porzinen H1N2-Kontrollviren (sw Ko: A/swine/England/17394/96, A/swine/Gent/7625/99) im Vergleich zu denen der swH1N2-FLUAV. Die Boxen repräsentieren die 25sten und 75sten Perzentile und die horizontalen Linien innerhalb der Boxen die Medianwerte. Die *Whiskers* reichen bis zu den 10ten und 90sten Perzentilen, bevor die Region der Ausreißer erreicht wird. Milde Ausreißer sind mit einem offenen Kreis gekennzeichnet.

Tabelle 18: Übersicht der bei den Box Plot-Analysen zum Neuraminidasehemmtest mit den humanen und porzinen Influenza-A-Viren für Oseltamivir und Zanamivir ermittelten Medianwerte.

FLUAV	Medianwerte [nM]	
	Oseltamivir	Zanamivir
huH1N1-Kontrollen ^a (n = 3)	0,41	0,54
huH1N1 (n = 25)	0,78	1,02
huH1N2 (n = 6)	0,36	3,25
swH1N1-Kontrollen ^b (n = 2)	0,28	0,33
swH1N1 (n = 46)	0,19	0,17
swH1N2-Kontrollen ^c (n = 2)	0,25	0,68
swH1N2 (n = 28)	0,26	0,69

^a A/Puerto Rico/8/34, A/Bayern/7/95, A/New Caledonia/20/99; ^b A/swine/Gent/V230/92, A/swine/Feldbach Austria/IDT5625/06; ^c A/swine/England/17394/96, A/swine/Gent/7625/99

Bei den Analysen wurden die H1N1-Isolate A/swine/Holzheim/IDT1502/06 (H1N1) und A/Berlin/60/05 als milder Ausreißer gegenüber Oseltamivir ($IC_{50} = 0,67$ bzw. $4,14$ nM) und der Stamm A/swine/Rotthalmünster/IDT5536/06 (H1N1) als milder Ausreißer gegenüber Zanamivir ($IC_{50} = 0,62$ nM) identifiziert. Die mittleren 50%igen Hemmkonzentrationen von Oseltamivir und Zanamivir gegenüber den untersuchten FLUAV sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Die NA der swH1N1-Isolate wurde mit $0,21 \pm 0,10$ nM Oseltamivir und $0,19 \pm 0,10$ nM Zanamivir zu 50 % inhibiert. Für die swH1N2-Stämme bedurfte es dafür $0,28 \pm 0,15$ nM Oseltamivir bzw. $0,78 \pm 0,49$ nM Zanamivir. Die beiden A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-Isolate „Berlin“ und „Dessau“ unterschieden sich nicht in ihrer NAI-Sensitivität. Bei den huH1N1-Isolaten waren für die 50%ige Hemmung des Enzyms $1,04 \pm 0,79$ nM Oseltamivir und $1,22 \pm 0,77$ nM Zanamivir erforderlich. Gegen die huH1N2-Stämme wirkte Oseltamivir im Konzentrationsbereich von $0,36 \pm 0,06$ nM und Zanamivir mit $3,34 \pm 0,40$ nM.

Bei diesem Test war eine Subtyp- und Testsubstanz-abhängige Empfindlichkeit der Viren zu verzeichnen. Die Viren des Subtyps N2 benötigten zur 50%igen Inhibition der NA im Vergleich zum Oseltamivir bei den huH1N2-FLUAV mehr als 9fach und bei den swH1N2-FLUAV ~ 3fach höhere Zanamivirkonzentration. Bei den N1-Isolaten wirkten die beiden Testsubstanzen sowohl bei den huH1N1- als auch bei den swH1N1-FLUAV in ähnlichen Konzentrationsbereichen. Generell glichen sich die mittleren IC_{50} -Werte der huFLUAV und swFLUAV für Oseltamivir. Grundsätzlich ließ sich feststellen, dass sich die 50%ige Hemmdosen für Zanamivir zwischen den huH1N2- und den swH1N2-FLUAV um den Faktor 4 unterschieden ($3,34 \pm 0,40$ nM im Vergleich zu $0,78 \pm 0,49$ nM). Die 50%ige Inhibition der huH1N1-Viren mit Zanamivir erforderte ebenfalls mehr als 6fach höheren

Substanzdosen als bei den swH1N1-FLUAV ($1,22 \pm 0,77$ nM im Vergleich zu $0,19 \pm 0,10$ nM).

Tabelle 19: Mittlere 50%ige Hemmkonzentration (IC_{50}) von Oseltamivir und Zanamivir gegenüber den humanen und porzinen Influenza-A-Viren vom Subtyp H1N1 und H1N2.

FLUAV	Mittelwert $IC_{50} \pm$ Standardabweichung [nM]	
	Oseltamivir	Zanamivir
huH1N1-Kontrollen ^a (n = 3)	$0,43 \pm 0,08$	$0,56 \pm 0,03$
huH1N1 (n = 25)	$1,04 \pm 0,79$	$1,22 \pm 0,77$
huH1N2 (n = 6)	$0,36 \pm 0,06$	$3,34 \pm 0,40$
swH1N1-Kontrollen ^b (n = 2)	$0,28 \pm 0,11$	$0,33 \pm 0,18$
swH1N1 (n = 46)	$0,21 \pm 0,10$	$0,19 \pm 0,10$
swH1N2-Kontrollen ^c (n = 2)	$0,25 \pm 0,06$	$0,68 \pm 0,39$
swH1N2 (n = 28)	$0,28 \pm 0,15$	$0,78 \pm 0,49$

^a A/Puerto Rico/8/34, A/Bayern/7/95, A/New Caledonia/20/99; ^b A/swine/Gent/V230/92, A/swine/Feldbach Austria/IDT5625/06; ^c A/swine/England/17394/96, A/swine/Gent/7625/99

Das Target für Oseltamivir und Zanamivir ist das virale NA-Glykoprotein. Parallel zum NA-Hemmtest wurde das komplette Genomsegment 6 sequenziert und auf AS-Substitutionen untersucht. In der Literatur sind Mutationen in diesem Protein beschrieben, die eine Resistenz gegenüber den NAI hervorrufen.¹³⁹ Bei den Viren vom Subtyp N1 sind die AS-Positionen 274 und 294 betroffen, die in klinischen Isolaten detektiert wurden. Substitutionen in den Positionen 119, 151, 222, 224, 276, 292, 294 und 371 bedingen eine niedrigere NAI-Empfindlichkeit von N2-Isolaten.

Die Analysen der AS-Sequenzen ergaben sowohl bei den humanen als auch den porzinen FLUAV keine der in der Literatur beschriebenen resistenzvermittelnden NA-Substitutionen (Daten nicht gezeigt; Datenbanknummern humane N1: FJ231812 – FJ231836 und humane N2: FJ231837 – FJ231842)¹⁷⁷, wodurch die gute Empfindlichkeit der Isolate gegenüber den beiden NA-Hemmern Oseltamivir und Zanamivir im Enzymhemmtest genotypisch bestätigt wurde.

NAI-Empfindlichkeit ausgewählter FLUAV in zellkulturbasierten Testen

Neben Veränderungen im viralen NA-Oberflächenprotein können Substitutionen in der HA1-Untereinheit die NAI-Empfindlichkeit in zellkulturbasierten Testen und *in vivo* beeinflussen.¹⁷⁸ Für zellkulturbasierte antivirale Untersuchungen ist die Durchführung von Plaquereduktions- und Virusertragshemmtesten weitverbreitet.^{145, 157, 178-181} Beide Teste

wurden mit ausgewählten Isolaten im Rahmen der vorliegenden Dissertation in MDCK-Zellen mit Oseltamivir und Zanamivir durchgeführt. Zusätzlich sollte der NAI-Einfluss auf die Ausbreitung ausgewählter swFLUAV mittels immunhistochemischer Färbungen des viralen NP in virusinfizierten MDCK-Zellen veranschaulicht werden.

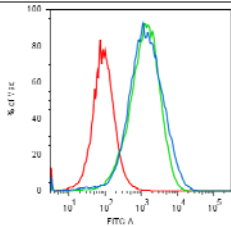
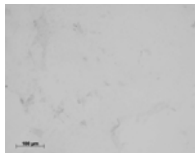
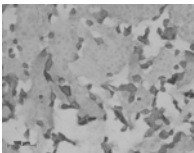
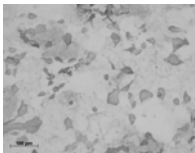
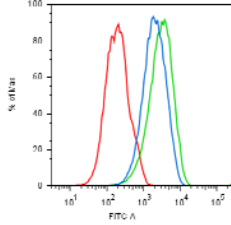
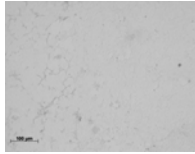
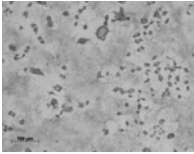
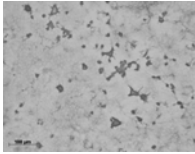
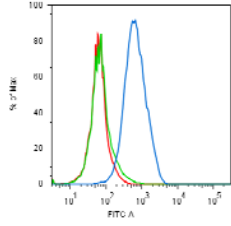
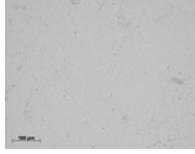
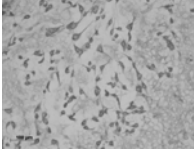
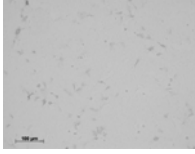
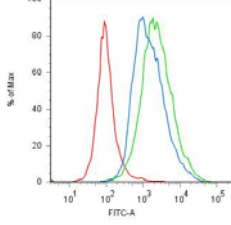

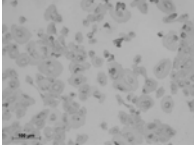
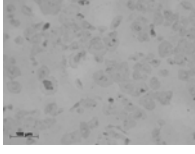
Nachweis spezifischer Sialinsäurereste auf Wirtszelloberflächen

Basierend auf Unterschieden in der HA-Struktur binden FLUAV spezifisch an Sialinsäurereste auf Wirtszelloberflächen, die über α 2,3- bzw. α 2,6-Bindungen mit Galaktose (NeuAc α 2,3Gal oder NeuAc α 2,6Gal) verknüpft sind.⁴⁰ In Hinblick auf Untersuchungen zur NAI-Empfindlichkeit der FLUAV in zellkulturbasierten Testen gab es Hinweise darauf, dass die Expression von α 2,3- bzw. α 2,6-Rezeptoren auf den verwendeten Zellen die Sensitivität der Viren beeinflusst.^{164, 182} Deshalb sollte die Rezeptorverteilung auf verschiedenen Influenza-sensitiven Zelllinien analysiert werden.

Tabelle 20 gibt einen Überblick über die erhaltenen Ergebnisse. Die in dieser Arbeit routinemäßig für die Passagierung der FLUAV eingesetzten MDCK-Zellen besaßen gleichermaßen hohe Anteile beider Sialinsäurereste auf ihren Zelloberflächen. In den FACS-Analysen wiesen 92,5 % der MDCK-SIAT1-Zellen NeuAc α 2,3Gal-Reste und 95,6 % dieser Zellen NeuAc α 2,6Gal-Reste auf. Ein deutlicher Unterschied in der Sialinsäureexpression konnte zwischen MDCK- und MDCK-SIAT1-Zellen nicht festgestellt werden. Ähnlich hohe Anteile an beiden Sialinsäureresten wurden auch auf NHBE-Zellen nachgewiesen. Im Unterschied dazu exprimierten MDBK-Zellen nur α 2,3-verknüpfte Sialinsäurereste.

Nicholls *et al.* wiesen in einem Review auf Unterschiede in den Lektinen verschiedener Hersteller hin.¹⁶² Demnach besteht das aus *Maackia amurensis* stammende Lektin MAA aus zwei Isoformen, von denen MAA-I sowohl an NeuAc α 2,6Gal- als auch an NeuAc α 2,3Gal-Reste binden soll, während nur MAA-II spezifisch für NeuAc α 2,3Gal sei. Das für den Nachweis α 2,3-verknüpfter Sialinsäurereste verwendete Lektin MAA aus dem DIG Glycan Differentiation Kit der Firma Roche bindet demzufolge unspezifisch auch NeuAc α 2,6Gal. Immunhistochemische Vergleichsfärbungen mit den Lektinen SNA und MAA des DIG Glycan Differentiation Kits von Roche und den Lektinen SNA, MAA-I sowie MAA-II von Vector ergaben keine Differenzen in den Ergebnissen (Daten nicht dargestellt). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass die in den Untersuchungen dieser Arbeit mit den Lektinen aus dem DIG Glycan Differentiation Kit von Roche generierten Daten aussagekräftig und repräsentativ für die analysierten Zelllinien sind.

Tabelle 20: Spezifischer Nachweis $\alpha 2,3$ - bzw. $\alpha 2,6$ -verknüpfter Sialinsäurereste auf der Oberfläche verschiedener Zelllinien mittels FACS-Analysen und Bilder der immunhistochemischen Färbung mithilfe der Lektine aus dem DIG Glycan Differentiation Kit von Roche bei 20facher Vergrößerung.

Zelllinie	FACS-Analyse ^a	immunhistochemischer Nachweis		
		Kontrolle	NeuAca $\alpha 2,3$ Gal	NeuAca $\alpha 2,6$ Gal
MDCK				
MDCK-SIAT1				
MDBK				
NHBE				

^a rot: Kontrolle ohne Lektine, blau: NeuAca $\alpha 2,3$ Gal, grün: NeuAca $\alpha 2,6$ Gal

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die im Labor verwendeten MDCK-Zellen für die routinemäßige Testung der antiviralen Wirksamkeit verschiedener Substanzen gegen FLUAV eignen. Ein großer Vorteil dieser Zellen besteht darin, dass sich aufgrund der Expression beider Rezeptortypen sowohl aviäre als auch humane FLUAV in ihnen replizieren. Ferner sind MDCK-Zellen besonders für die Testung von swFLUAV geeignet, weil bei den zirkulierenden H1-Subtypen sowohl *avian*- (H1N1) als auch *human-like* (H1N2) HA-Oberflächenproteine exprimiert werden.¹⁸³⁻¹⁸⁵

Empfindlichkeit ausgewählter porciner Influenza-A-Viren gegenüber Oseltamivir und Zanamivir im Plaquereduktionstest

Mit ausgewählten swFLUAV erfolgten phänotypische Untersuchungen zur NAI-Empfindlichkeit mittels Plaquereduktionstesten in MDCK-Zellen. In drei unabhängigen Versuchen mit zwei Parallelen wurden die 50%igen Hemmkonzentrationen (IC_{50}) von Oseltamivir und Zanamivir ermittelt. Da die NAI die Plaquegröße unmittelbar beeinflussen und in der Literatur starke Abweichungen in den IC_{50} -Werten bezogen auf die Plaqueanzahl bzw. -größe beschrieben wurden,^{178, 186, 187} sind in Tabelle 21 sowohl die Werte für eine 50%ige Hemmung der Plaqueanzahl als auch der Plaquegröße zusammengefasst. Die Plaquegrößen der H1N1-Isolate A/swine/Potsdam/15/81, A/swine/Schwerin/103/89 und A/swine/Bakum/5/95 wurden bereits in niedrigen Substanzkonzentrationen von 0,01 – 0,15 μ M inhibiert, während die NAI die Plaquedurchmesser von A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ und A/swine/Bakum/1832/00 und A/swine/Bakum/1833/00 (beide H1N2) selbst in über 50fach höheren Konzentrationen nicht beeinflussten.

Tabelle 21: Empfindlichkeit ausgewählter porciner Influenza-A-Viren vom Subtyp H1N1^a und H1N2^b gegenüber den Neuraminidaseinhibitoren Oseltamivir und Zanamivir im Plaquereduktionstest in MDCK-Zellen.

swFLUAV	IC_{50} [μ M]			
	Plaqueanzahl		Plaquegröße	
	Oseltamivir	Zanamivir	Oseltamivir	Zanamivir
Potsdam/15/81^a	0,04	0,03	0,02	0,01
Schwerin/103/89^a	0,73	0,82	0,01	0,13
Bakum/5/95^a	0,17	2,29	0,05	< 0,15
Belzig/2/01-„Berlin“^a	> 2,59	> 150	> 2,59	> 100
Bakum/1832/00^b	> 2,59	> 150	> 2,59	> 100
Bakum/1833/00^b	> 2,59	> 150	> 2,59	> 100

Empfindlichkeit ausgewählter Influenza-A-Viren gegenüber Oseltamivir und Zanamivir im Virusertragshemmtest

Der Virusertragshemmtest stellte eine weitere Methode zur Bestimmung der NAI-Empfindlichkeit in der Zellkultur dar. Tabelle 22 gibt einen Überblick über die im Test mit drei parallelen Ansätzen nach der Virusinfektion mit einer MOI von 0,1 TCID₅₀/Zelle und 14 h Versuchsdauer in MDCK-Zellen ermittelten IC_{90} -Werte für Oseltamivir und Zanamivir gegenüber ausgewählten swFLUAV.

Tabelle 22: Empfindlichkeit ausgewählter porciner Influenza-A-Viren vom Subtyp H1N1 und H1N2 gegenüber Oseltamivir und Zanamivir im Virusertragshemmtest in MDCK-Zellen 14 h nach der Inokulation mit einer MOI von 0,1 TCID₅₀/Zelle .

swFLUAV	Subtyp	IC ₉₀ [µM]	
		Oseltamivir	Zanamivir
Potsdam/15/81	H1N1	5,65	0,54
Schwerin/103/89	H1N1	10,71	0,29
Bakum/5/95	H1N1	14,35	2,71
Belzig/2/01-„Berlin“	H1N1	> 259	265
Bakum/1832/00	H1N2	22,08	25,09
Bakum/1833/00	H1N2	23,40	26,45

Der Virusertrag der Isolate A/swine/Potsdam/15/81, A/swine/Schwerin/103/89 und A/swine/Bakum/5/95 (alle H1N1) konnte mit Oseltamivirkonzentrationen von 5,65 – 14,35 µM Oseltamivir und Zanamivirkonzentrationen von 0,29 – 2,71 µM zu 90 % inhibiert werden. Auffällig war die geringe Sensitivität von A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ gegenüber beiden Testsubstanzen mit IC₉₀-Werten von > 259 µM Oseltamivir und 265 µM Zanamivir. Die beiden H1N2-Viren A/swine/Bakum/1832/00 und A/swine/Bakum/1833/00 waren mit IC₉₀-Werten von 22,08 bzw. 23,40 µM Oseltamivir und 25,09 bzw. 26,45 µM Zanamivir ebenfalls als um mehr als das 10fache unempfindlicher als die anderen untersuchten Isolate.

Weil die NAI-Testung in MDCK-Zellen zu falsch-positiven und falsch-negativen Ergebnissen führen kann,^{127, 178, 188} wird in der Literatur die Verwendung von NHBE-Zellen für die phänotypische Analyse der NAI-Empfindlichkeit von FLUAV mit unterschiedlicher Rezeptorpräferenz empfohlen.¹⁵⁷ Da sich die beiden A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-Isolate „Berlin“ und „Dessau“ deutlich in ihrer Replikationsfähigkeit in Zelllinien mit unterschiedlicher Rezeptorexpression unterscheiden (Abbildung 3), sollte ihre Suszeptibilität gegenüber Oseltamivir in Virusertragshemmtesten in MDCK- sowie ausdifferenzierten NHBE-Zellen verglichen werden. Bei diesen Untersuchungen wurden die Versuchsbedingungen in Anlehnung an die zuvor zitierte Publikation gewählt.¹⁵⁷

In Tabelle 23 sind die für die beiden A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-Isolate ermittelten Ergebnisse aus den antiviralen Untersuchungen im Enzymhemm- und Virusertragshemmtest zusammengefasst. Die zuvor im Virusertragshemmtest in MDCK-Zellen bei Infektion mit einer MOI von 0,1 TCID₅₀/Zelle nach 14 h detektierte Unempfindlichkeit von A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ gegenüber Oseltamivir (Tabelle 22) wurde bei verlängerter Versuchsdauer von 48 h und niedriger MOI (0,0005

TCID₅₀/Zelle) bestätigt. Aus den zellkulturbasierten Testen auf MDCK-Zellen resultierte eine 34fach und auf NHBE-Zellen eine 22fach geringere Oseltamivirempfindlichkeit von A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ im Vergleich zu A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“.

Tabelle 23: Antivirale Empfindlichkeit der A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-Isolate „Berlin“ und „Dessau“ gegenüber Oseltamivir und Zanamivir im Neuraminidase-Hemmtest sowie gegenüber Oseltamivir im Virusertragshemmtest in MDCK- bzw. ausdifferenzierten NHBE-Zellen.

A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-	IC ₅₀ [nM]		IC ₉₀ [nM]	
	NA-Hemmtest		Virusertragshemmtest	
	Oseltamivir	Zanamivir	MDCK ^a	NHBE ^b
„Berlin“	0,34	0,54	802	> 10
„Dessau“	0,85	0,84	23	0,46

^a 48 h nach der Infektion mit einer MOI von 0,0005 TCID₅₀/Zelle; ^b 24 h nach der Infektion mit einer MOI von 0,1 TCID₅₀/Zelle

Zur phänotypischen Untersuchung der Empfindlichkeit ausgewählter huFLUAV gegenüber den NA-Hemmern wurden die Virusertragshemmteste bei niedriger MOI (0,0005 TCID₅₀/Zelle) und 48-stündiger Versuchsdauer durchgeführt. Neben den H1N1-Referenzstämmen (A/Puerto Rico/8/34, A/Bayern/7/95 und A/New Caledonia/20/99) wurde das im NA-Hemmtest sensitive H1N1-Isolat A/Berlin/18/05, der milde Ausreißer A/Berlin/60/05 und das Isolat A/Bremen/4/05 mit leicht erhöhten IC₅₀-Werten untersucht. Ebenfalls in die Untersuchungen einbezogen wurden drei H1N2-Isolate. In Tabelle 24 sind die im Test mit drei parallelen Ansätzen ermittelten IC₉₀-Werte dargestellt. Die Mehrzahl der Isolate konnte im Konzentrationsbereich von 0,43 ± 0,39 µM Oseltamivir bzw. 0,95 ± 0,87 µM Zanamivir zu 90 % inhibiert werden. Für die beiden H1N1-Isolate A/Berlin/60/05 und A/Bremen/4/05, für die auch im Enzymhemmtest 2 – 4,5fach höhere NAI-Konzentrationen zur 50%igen Hemmung der NA-Aktivität eingesetzt werden mussten, wurden mittlere Oseltamivir- und Zanamivirkonzentrationen von > 20 µM ermittelt.

Tabelle 24: Empfindlichkeit ausgewählter humaner Influenza-A-Viren vom Subtyp H1N1 und H1N2 im Virusertragshemmtest mit Oseltamivir und Zanamivir in MDCK-Zellen 48 h nach der Infektion mit einer MOI von 0,0005 TCID₅₀/Zelle.

huFLUAV	Subtyp	IC ₉₀ [µM]	
		Oseltamivir	Zanamivir
Puerto Rico/8/34	H1N1	0,2	0,3
Bayern/7/95	H1N1	0,9	1,5
New Caledonia/20/99	H1N1	0,2	0,3
Berlin/18/05	H1N1	1,1	1,7
Berlin/60/05	H1N1	> 20	> 20
Bremen/4/05	H1N1	> 20	> 20
05.03.02/Sachsen	H1N2	0,1	2,3
Baden-Württemberg/20/03	H1N2	0,2	0,3
Sachsen/678/03	H1N2	0,2	0,3

Einfluss von Oseltamivir und Zanamivir auf die Ausbreitung ausgewählter porciner Influenza-A-Viren in MDCK-Zellen

Der Einfluss der NA-Hemmer Oseltamivir und Zanamivir auf die Virusausbreitung in MDCK-Zellen konnte immunhistochemisch mittels APAAP-Färbung des viralen NP 48 h nach der Infektion mit einer MOI von 0,0005 TCID₅₀/Zelle (Abbildung 5) verdeutlicht werden. Virusinfizierte Zellen wurden bei dieser Methode rot angefärbt. Die unbehandelten Viruskontrollen durchliefen einen Mehrstufen-Replikationszyklus, welcher zur Infektion nahezu aller Zellen dieser Ansätze führte. Die Behandlung mit 1 µg/ml Oseltamivir bzw. Zanamivir resultierte in der Unterbindung der Virusausbreitung der porcinen H1N1-Isolate A/swine/Potsdam/15/81, A/swine/Schwerin/103/89, A/swine/Bakum/5/95 und A/swine/Belzig/2/01-„Dessau“. Der NP-Nachweis blieb bei diesen Viren in den substanzbehandelten Ansätzen auf die Stellen der Erstinfektion beschränkt, sichtbar an den wenigen rotmarkierten, virusinfizierten Zellen. Hingegen ließ sich die Virusausbreitung bei den Isolaten A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ sowie A/swine/Bakum/1832/00 und A/swine/Bakum/1833/00 (beide H1N2) nicht durch die beiden NAI hemmen. Wie in den unbehandelten Viruskontrollen konnte hier das virale NP bedingt durch die ungehinderte Virusausbreitung auch in den substanzbehandelten Ansätzen in fast allen Zellen nachgewiesen werden.

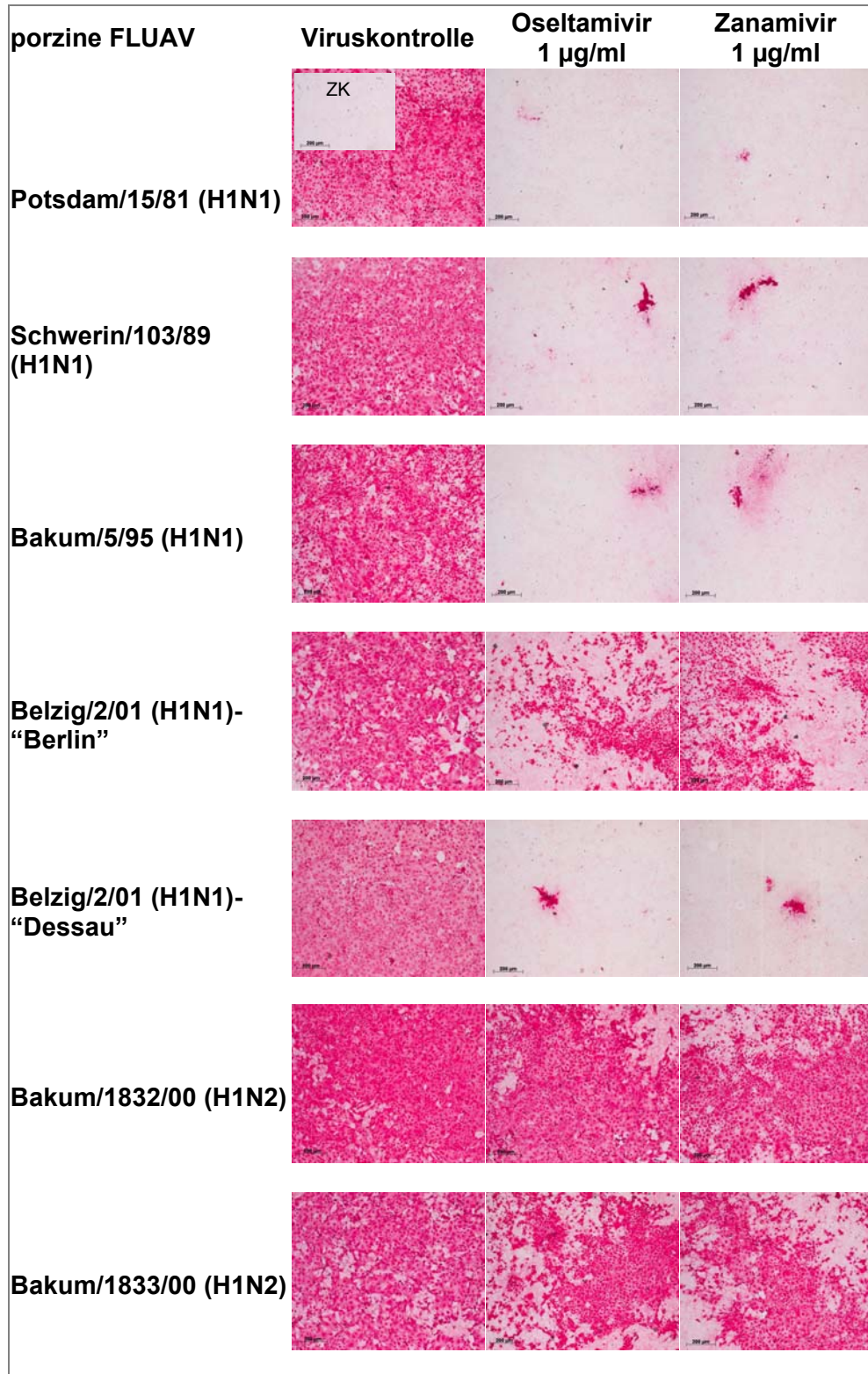


Abbildung 5: Einfluss der Oseltamivir- und Zanamivirbehandlung auf die Ausbreitung ausgewählter porziner Influenza-A-Viren in MDCK-Zellen, nachgewiesen durch die immunhistochemische Färbung des viralen Nukleoproteins 48 h nach der Virusinokulation mit einer MOI von 0,0005 TCID₅₀/Zelle. Dargestellt sind die unbehandelten Viruskontrollen im Vergleich zur Zellkontrolle (ZK) und substanzbehandelten virusinfizierten Zellen bei 10facher Vergrößerung.

Neben AS-Veränderungen in NA-Oberflächenprotein können Substitutionen im HA, u. a. in den AS der Rezeptorbindestellen und in deren Nähe, indirekt die Wirkung von NA-Hemmern in zellkulturbasierten Testen beeinflussen.^{125, 144, 145, 188} Im Rahmen dieser

Dissertation lag das Hauptaugenmerk auf der Analyse der globulären HA1-Untereinheit des Glykoproteins, da diese für die Rezeptorbindung der Viren von Bedeutung ist.

Die im Ergebnis der Sequenzierung erhaltenen kompletten Sequenzen des HA-kodierenden Gensegments der huFLUAV wurden in die GenBank eingetragen (Datenbanknummern: FJ231761 – FJ231791)¹⁷⁷. Sowohl bei den für die zellkulturbasierten Untersuchungen zur NAI-Empfindlichkeit ausgewählten porzinen als auch bei den humanen Isolaten konnten Veränderungen hinsichtlich der Anzahl und Position potentieller N-Glykosylierungsstellen und in den Rezeptorbindestellen ermittelt werden. Diese sind in den Tabellen 25 und 26 zusammengefasst.

Tabelle 25: Potentielle N-Glykosylierungsstellen (H3-Nummerierung) in der HA1-Untereinheit der für die zellkulturbasierten Untersuchungen ausgewählten humanen und porzinen Influenza-A-Viren der Subtypen H1N1^a und H1N2^b. Alle humanen Isolate ohne Veränderungen in den entsprechenden Positionen sind in einer Gruppe zusammengefasst. Die Aminosäuren 20, 21 und 33 sind nicht einzeln aufgeführt, weil alle Isolate an diesen Positionen potentiell glykosyliert sind.

FLUAV	potentielle N-Glykosylierungsstellen in AS									
	64	94a	129	158	163	165	198	271	276	289
sw/Potsdam/15/81 ^a	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
sw/Schwerin/103/89 ^a	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
sw/Bakum/5/95 ^a	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-
sw/Belzig/2/01 ^a	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-
sw/Bakum/1832/00 ^b	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
sw/Bakum/1833/00 ^b	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
Puerto Rico/8/34 ^a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Bayern/7/95 ^a	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+
Baden-W./20/03 ^b	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Sachsen/678/03 ^b	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
humane H1*	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+

* H1N1: A/New Caledonia/20/99, A/Berlin/18/05, A/Berlin/60/05, A/Bremen/4/05; H1N2: A/05.03.02/Sachsen

Tabelle 26: Vergleich der Aminosäuren der Rezeptorbindungsstelle des Hämagglutinin¹⁸⁹ der für die zellkulturbasierten Untersuchungen ausgewählten humanen und porzinen Influenza-A-Viren der Subtypen H1N1 und H1N2. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden Isolate ohne Veränderungen in den entsprechenden Positionen zu Gruppen zusammengefasst. Einzeln aufgeführt sind Virusisolate mit Substitutionen in der Rezeptorbindungsstelle (grau hinterlegt).

FLUAV	AS der Rezeptorbindungsstelle						
	98	153	155	183	190	194	195
swH1N1 ^a	Y	W	V	H	D	L	Y
swH1N2 ^b	Y	W	T	H	D	I	Y
huH1N1 + H1N2	Y	W	T	H	D	L	Y
Puerto Rico/8/34 (H1N1)	Y	W	T	H	E	I	Y
Bayern/7/95 (H1N1)	H	W	V	H	D	I	Y
huH1N2 ^c	Y	W	V	H	N	L	Y

FLUAV	AS links der Rezeptorbindungsstelle					
	224	225	226	227	228	229
sw/Potsdam/15/81 (H1N1)	K	G	Q	E	G	R
sw/Schwerin/103/89 (H1N1)	N	G	Q	A	G	R
sw/Bakum/5/95 (H1N1)	R	G	Q	A	G	R
sw/Belzig/2/01-„Berlin“ (H1N1)	R	E	Q	A	G	R
sw/Belzig/2/01-„Dessau“ (H1N1)	R	G/E	Q	A	G	R
swH1N2 ^b	R	D	Q	E	G	R
huH1N1 + H1N2	R	D	Q	E	G	R
Puerto Rico/8/34 (H1N1)	R	D	Q	A	G	R
Bayern/7/95 (H1N1)	R	G	Q	E	G	R
Bremen/4/05 (H1N1)	R	N	Q	E	G	R

FLUAV	AS rechts der Rezeptorbindungsstelle				
	134	135	136	137	138
sw/Potsdam/15/81 (H1N1)	G	V	T	A	A
sw/Schwerin/103/89 (H1N1)	G	T	T	A	A
sw/Bakum/5/95 (H1N1)	G	A	T	A	A
sw/Belzig/2/01-„Berlin“ (H1N1)	G	T	T	V	A
sw/Belzig/2/01-Dessau“ (H1N1)	G	T	T	V	A/S
swH1N2 ^b	G	V	T	A	S
Puerto Rico/8/34 (H1N1)	G	V	T	A	A
huH1N1 + H1N2	G	V	S	A	S

^a swH1N1: A/sw/Potsdam/15/81, A/sw/Schwerin/103/89, A/sw/Bakum/5/95, A/sw/Belzig/2/01-„Berlin“ und -„Dessau“; ^b swH1N2: A/sw/Bakum/1832/00 und A/sw/Bakum/1833/00; ^c huH1N2: A/Sachsen/678/03, A/05.03.2002/Sachsen

Die beiden in den zellkulturbasierten Analysen Oseltamivir- und Zanamivir-resistenten H1N2-Isolate A/swine/Bakum/1832/00 und A/swine/Bakum/1833/00 exprimierten zusätzliche potentielle N-Glykosylierungsstellen an den Positionen Asn158, Asn163 und Asn271, die bei den anderen swFLUAV nicht nachgewiesen werden konnten.

Im Vergleich zum *in vitro* sensitiven Virus A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“ ergab die Genotypisierung des in den zellkulturbasierten Untersuchungen NAI-unempfindlichen Isolates A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ AS-Austausche an den Positionen 138 und 225 (H3-Nummerierung).

Im Ergebnis der *In vitro*-Untersuchungen zur Empfindlichkeit der im Rahmen der vorliegenden Dissertation analysierten porzinen und humanen FLUAV kann zusammenfassend Folgendes festgehalten werden:

- i) Während die huFLUAV sensitiv gegenüber dem M2-Ionenkanalblocker Amantadin sind, sind alle von 1989 bis 2006 isolierten porzinen Isolate resistent. Die genotypischen Befunde korrelierten direkt mit dem in MDCK-Zellen ermittelten Phänotyp.
- ii) Im NA-Hemmtest waren alle humanen und porzinen FLUAV sensitiv gegenüber den NA-Hemmern Oseltamivir und Zanamivir.
- iii) Die zwei humanen Isolate mit erhöhten IC₅₀-Werten im NA-Hemmtest erwiesen sich auch im zellkulturbasierten Virusertragshemmtest in MDCK-Zellen um mehr als das 10fache unempfindlicher gegenüber den beiden NAI im Vergleich zu den anderen getesteten huFLUAV, gegen die die beiden Testsubstanzen wirkten.
- iv) Von den für die zellkulturbasierten Untersuchungen ausgewählten swFLUAV waren A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ und die beiden H1N2-Stämme A/swine/Bakum/1832/00 und A/swine/Bakum/1833/00 trotz guter Empfindlichkeit im NA-Hemmtest unempfindlich gegenüber Oseltamivir und Zanamivir in MDCK-Zellen.
- v) Die ausgewählten swH1N2-Viren exprimieren zusätzliche potentielle N-Glykosylierungsstellen im HA-Oberflächenprotein an den Positionen Asn158, Asn163 und Asn271. Asn163 wurde auch in sensitiven huFLUAV nachgewiesen.
- vi) Die beiden A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-Isolate „Berlin“ und „Dessau“ unterscheiden sich genotypisch im HA-Oberflächenprotein und phänotypisch in ihrem Hämagglutinationsverhalten gegenüber Hühnererythrozyten sowie hinsichtlich ihrer NAI-Empfindlichkeit in den zellkulturbasierten Testen (Tabelle 27).

Tabelle 27: Zusammenfassung der phänotypischen Eigenschaften der A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-Isolate „Berlin“ und „Dessau“ im Hämagglutinationstest mit Hühnerythrozyten und im Neuraminidasehemm- (NA-HT) sowie Virusertragshemmtest (VE-HT) und Ergebnisse der HA-Genotypisierung.

Isolat	Hämagglutination	Empfindlichkeit <i>in vitro</i>		HA AS-Position	
		NA-HT	VE-HT	138	225
„Berlin“	Shift	sensitiv	resistent	A	E
„Dessau“	+	sensitiv	sensitiv	A/S	E/G

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Isolate A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ und „Dessau“, A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2) sowie die huFLUAV A/New Caledonia/20/99 (H1N1) und A/Berlin/60/05 (H1N1) für weitere Untersuchungen zur antiviralen Empfindlichkeit gegenüber Oseltamivir *in vivo* ausgewählt.

6.2 Phylogenetische Verwandtschaft porziner und humaner Influenza-A-Viren des Subtyps H1 im M2-, HA- und NA-Protein

Die hohe Prävalenz der Amantadinresistenz in europäischen swFLUAV (siehe Punkt 6.1.1) warf die Frage einer möglichen Übertragung dieses resistenten M-Gens auf die saisonalen humanen Viren auf.

In die Berechnung des phylogenetischen Stammbaums in Abbildung 6 basierend auf den 97 AS des M2-Proteins wurden alle in der GenBank (Stand 29.05.2009) enthaltenen humanen und porzinen europäischen Isolate zwischen 1980 und 2009 einbezogen. Unter Ausschluss identischer Sequenzen beinhaltet der Stammbaum 96 Virusisolate verschiedener Subtypen. Der Baum kann in zwei deutlich voneinander unterscheidbare Gruppen eingeteilt werden. Gruppe 1 vereint die porzinen und Gruppe 2 die humanen FLUAV. In der Gruppe der swFLUAV sind 2 humane Isolate aus dem Jahr 2009 zu finden, die in der Abbildung mit einem Pfeil gekennzeichnet sind. Bei diesen Stämmen handelt es sich um Viren der im Jahr 2009 aufgetretenen H1N1-Pandemie, bei der eine Reassortierung mit einem porzinen M-Genomsegment der eurasischen Linie nachgewiesen wurde.⁶⁸ Mit Ausnahme dieser pandemischen Stämme konnte in dieser phylogenetischen Analyse keine Übertragung der resistenten porzinen M-Gene auf die humane Bevölkerung in Europa nachgewiesen werden. Wie dieser Stammbaum verdeutlicht, zirkulierten die beiden M2-Proteine über den Zeitraum von über 20 Jahren parallel.

Ergebnisse

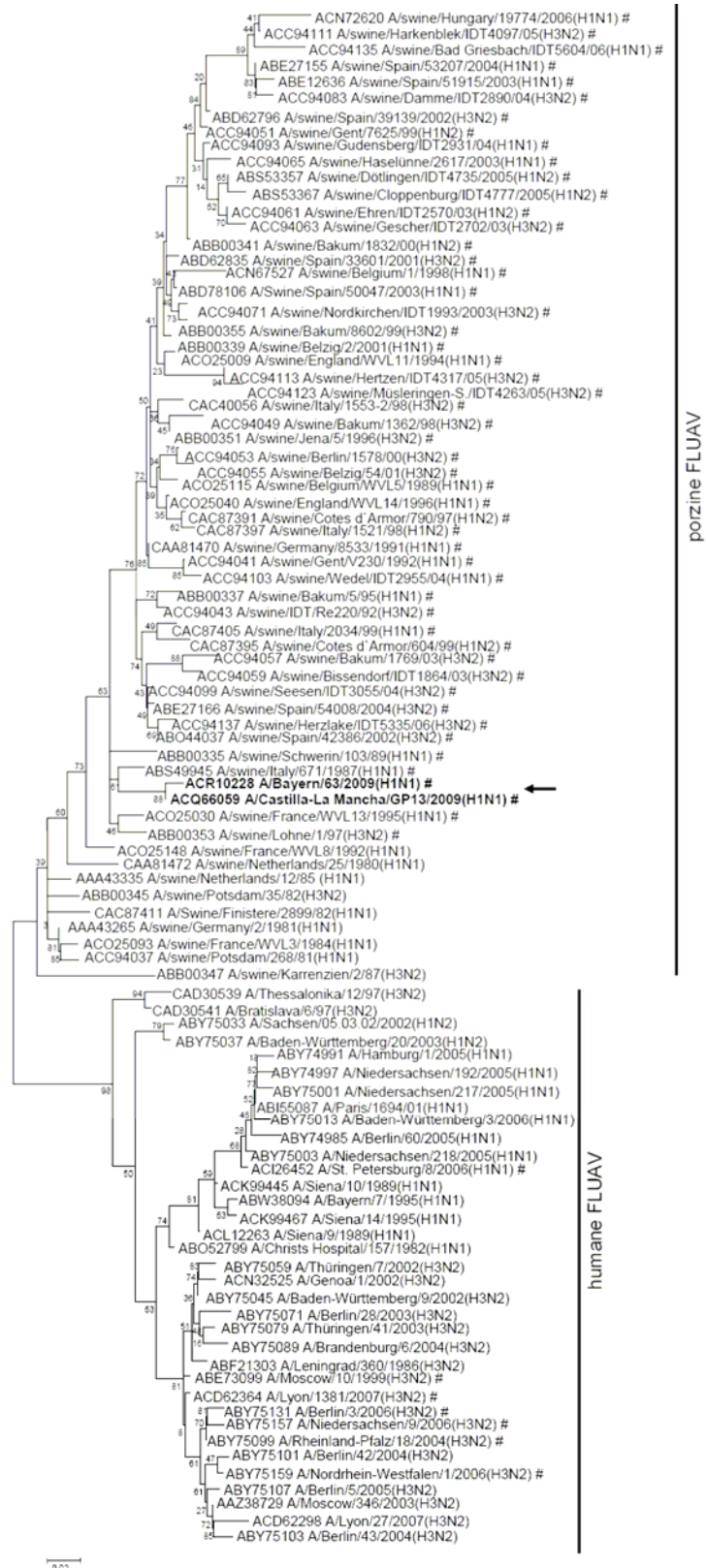


Abbildung 6: Phylogenetische Analyse des M2-Proteins europäischer humaner und porziner Influenza-A-Viren aus den Jahren 1980 bis 2009. Der *Neighbor Joining* Stammbaum der 97 Aminosäuren des integralen Membranproteins basierend auf dem JTT Substitutionsmodell mit 1.000 Replikationen¹⁶⁹ und wurde mit MEGA 4.0¹⁶⁸ erstellt. Resistente Viren mit der S31N-Substitution sind mit # gekennzeichnet.

Die Unterschiede in der Zanamivir-Empfindlichkeit der humanen und porzinen H1N1- sowie H1N2-Isolate ließen unterschiedliche phylogenetische Ursprünge der NA-Oberflächenproteine dieser Isolate vermuten. Für die phylogenetischen Analysen wurden zunächst alle in der GenBank (Stand 11.06.2009) enthaltenen humanen und porzinen europäischen Isolate zwischen 1980 und 2009 einbezogen. Unter Ausschluss identischer Sequenzen und Auswahl repräsentativer Viren wurden Stammbäume basierend auf den NA-AS-Sequenzen erstellt.

Der 78 Virusisolate umfassende N1-Stammbaum unterscheidet zwei Gruppen deutlich voneinander: i) humane und ii) porzine FLUAV einschließlich der Pandemiestämme (Abbildung 7).

Der N2-Stammbaum in Abbildung 8 umfasst 97 Virusisolate. Auch bei diesem Subtyp sind die swFLUAV deutlich von den humanen Stämmen zu unterscheiden und bilden eine eigene Gruppe. Die Gruppe der huFLUAV kann in drei (H3N2 bis 2004, H3N2 ab 2003/04 und H1N2) und die Gruppe der swFLUAV in zwei Subcladen (H3N2 und H1N2) unterteilt werden. Die beiden H1N2-Stämme A/swine/Dötlingen/IDT4777/2005 und A/swine/Cloppenburg/IDT4735/2005 sind mit den swH3N2-Stämmen und das H3N2-Isolat A/swine/Nordkirchen/IDT1993/2003 ist mit den swH1N2-Viren nahverwandt.

Für die Rezeptorbindung der FLUAV ist das HA-Oberflächenprotein zuständig, wobei zum einen die AS der Rezeptorbindungsstelle und zum anderen die Anzahl der Glykosylierungsstellen eine Rolle spielen. Der Vergleich der Ergebnisse der *In vitro*-Untersuchungen und Genotypisierung der swFLUAV ließ einen möglichen Einfluss von Glykosylierungsstellen auf die NA-Empfindlichkeit der Viren des Subtyps H1N2 vermuten. In die Berechnung des phylogenetischen Stammbaums der HA1-Untereinheit in Abbildung 9 wurden ebenfalls alle in der GenBank (Stand 11.06.2009) enthaltenen humanen und porzinen europäischen H1-Isolate zwischen 1980 und 2009 einbezogen. Unter Ausschluss identischer Sequenzen beinhaltet der Stammbaum 84 Virusisolate verschiedener Subtypen. Es sind zwei *Cluster* voneinander zu unterscheiden: i) huFLUAV und swH1N2-FLUAV mit *human-like* HA sowie ii) huFLUAV der 2009 aufgetretenen Pandemie und swH1N1-FLUAV. Das Hauptaugenmerk bei der Stammbaumanalyse lag auf den Glykosylierungsstellen. Alle Isolate des ersten Clusters exprimierten an AS-Position 163 eine potentielle Glykosylierungsstelle, welche bei den porzinen H1-Viren nicht nachgewiesen werden konnte.

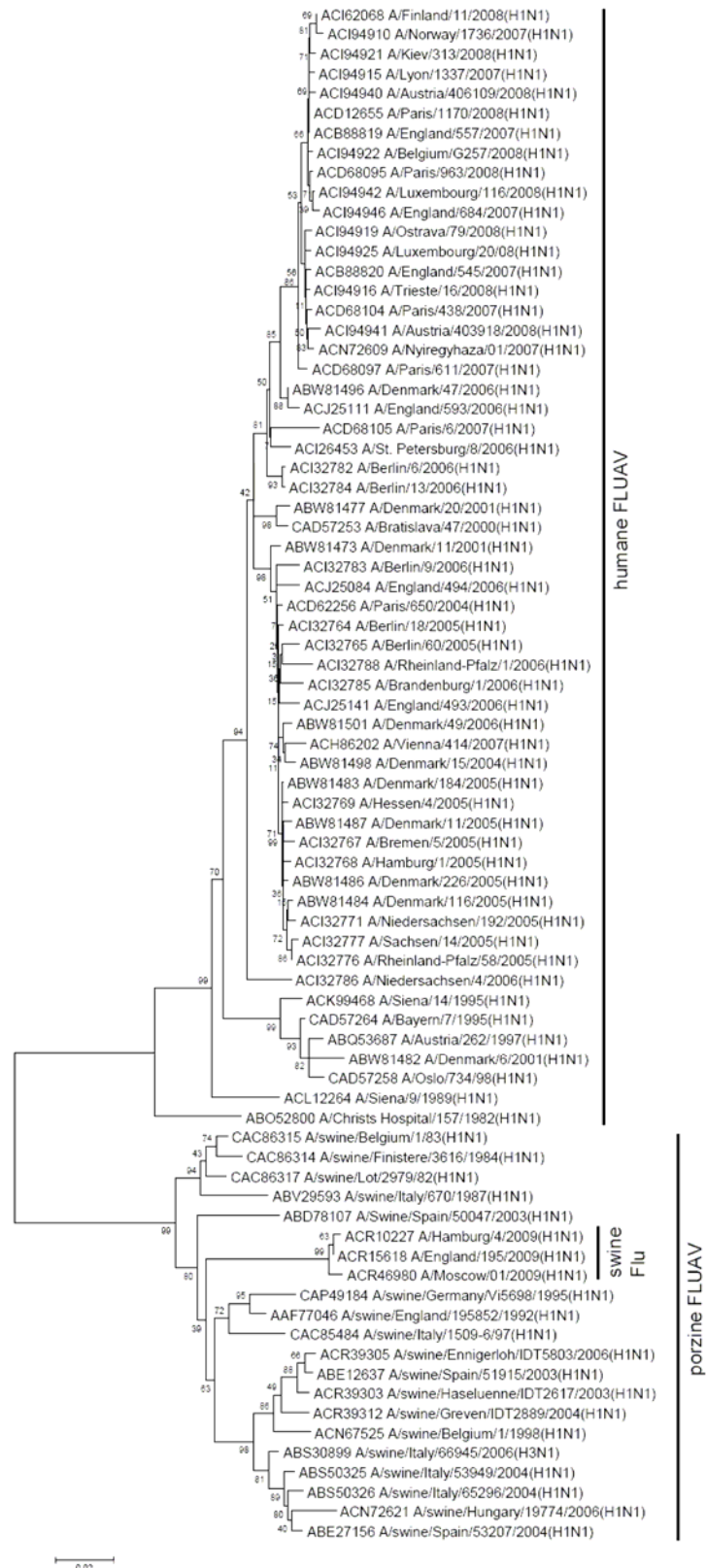


Abbildung 7: Phylogenetische Analyse der Neuraminidase porciner und humaner Influenza-A-Viren des Subtyps H1N1. Der *Neighbor Joining* Stammbaum der 78 Isolate aus den Jahren 1980 bis 2009 basiert auf dem JTT Substitutionsmodell mit 1.000 Replikationen¹⁶⁹ und wurde mit dem Programm MEGA 4.0¹⁶⁸ erstellt.

Ergebnisse

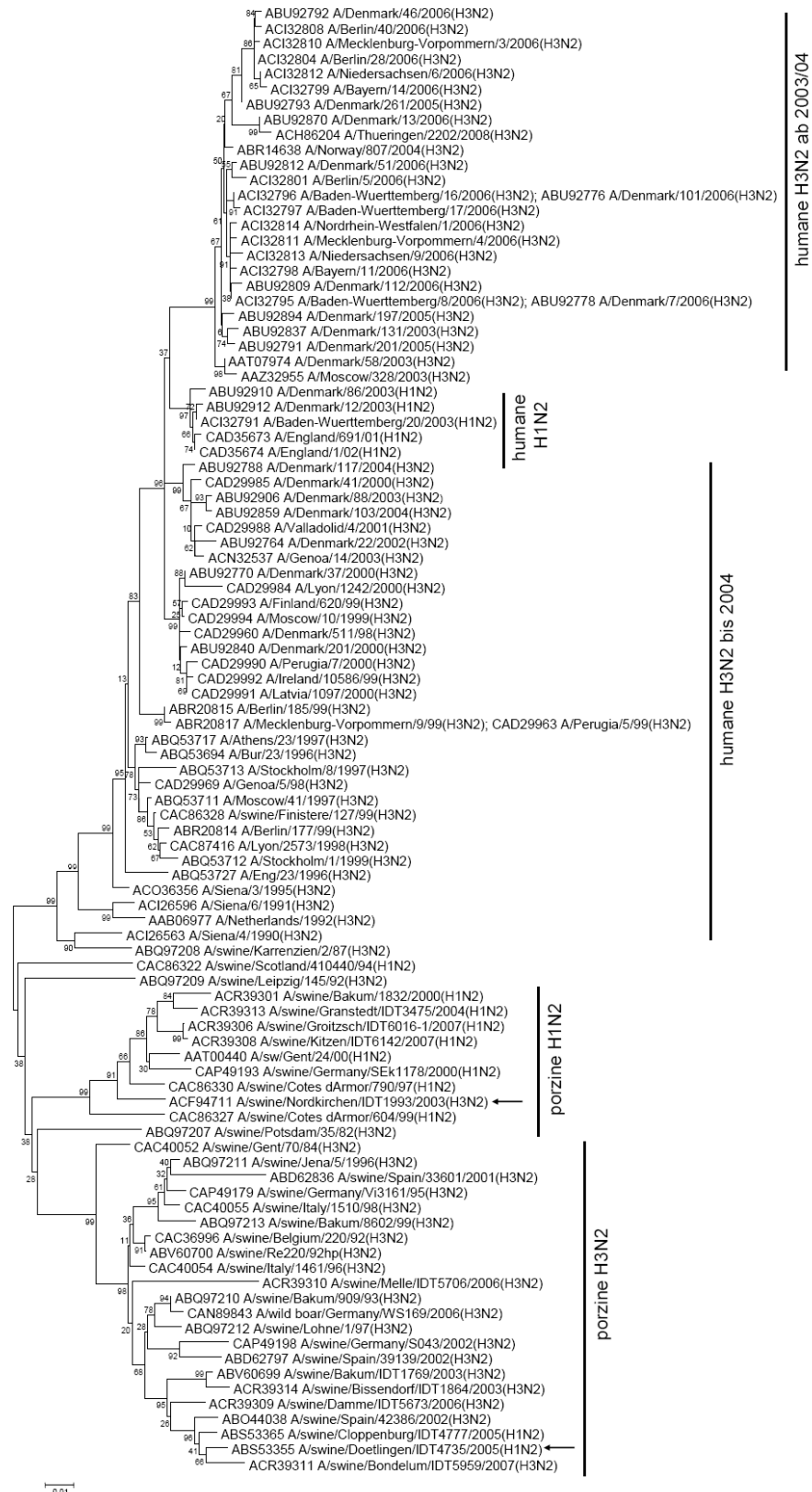


Abbildung 8: Phylogenetische Analyse der Neuraminidase porziner und humaner Influenza-A-Viren der Subtypen H1N2 und H3N2. Der *Neighbor Joining* Stammbaum der 97 Isolate aus den Jahren 1980 bis 2009 basiert auf dem JTT Substitutionsmodell mit 1.000 Replikationen¹⁶⁹ und wurde mit dem Programm MEGA 4.0¹⁶⁸ erstellt.

Ergebnisse

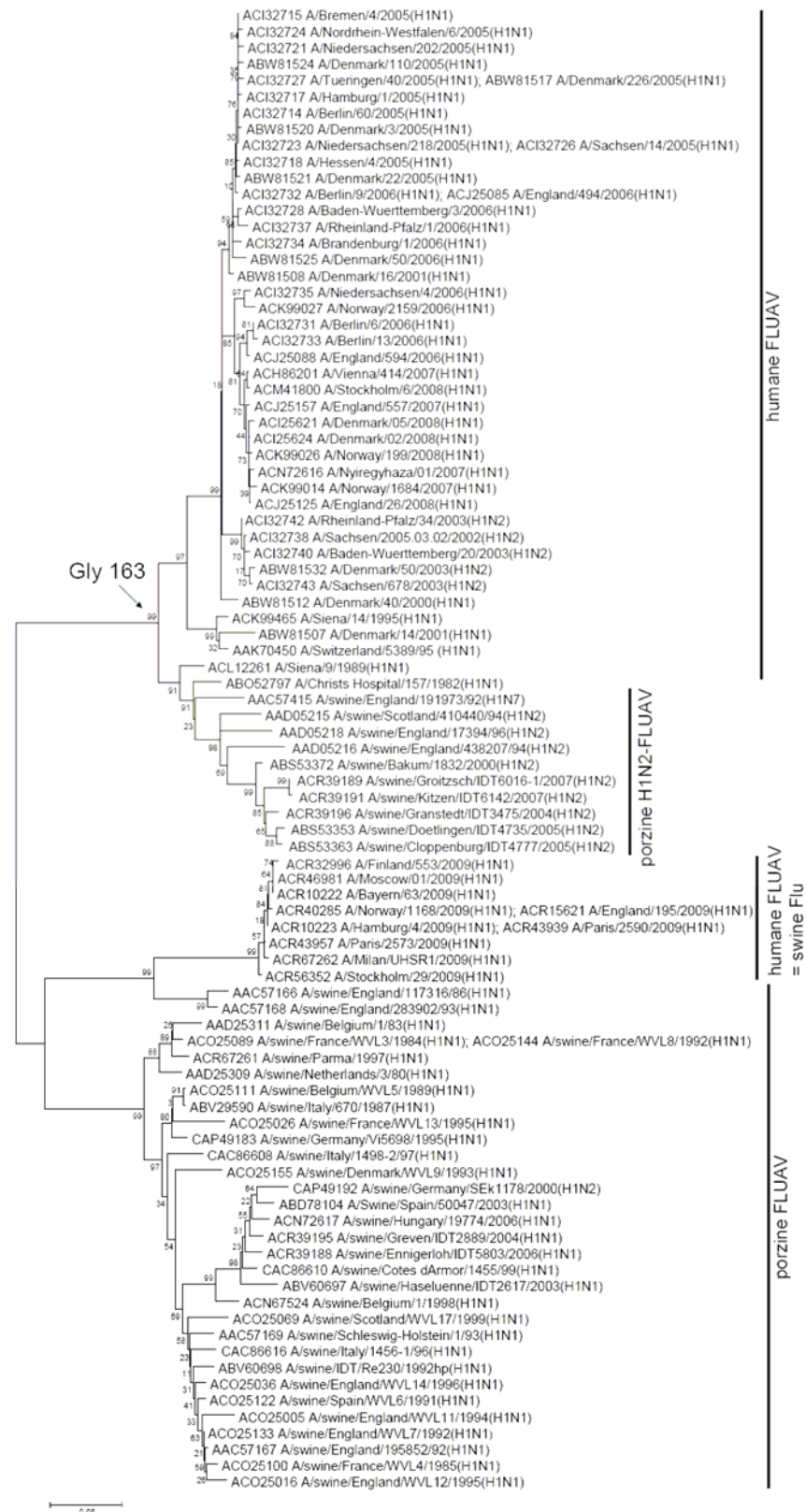


Abbildung 9: Phylogenetische Analyse der HA1-Untereinheit porziner und humaner Influenza-A-Viren des Subtyps H1. Der *Neighbor Joining* Stammbaum der 84 Isolate aus den Jahren 1980 bis 2009 basiert auf dem JTT Substitutionsmodell mit 1.000 Replikationen¹⁶⁹ und wurde mit dem Programm MEGA 4.0¹⁶⁸ erstellt.

6.3 Oseltamivirempfindlichkeit ausgewählter porciner und humaner Influenza-A-Viren *in vivo*

Die anhand der *In vitro*-Ergebnisse ausgewählten FLUAV A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ und -„Dessau“, A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2), A/New Caledonia/20/99 (H1N1) und A/Berlin/60/05 (H1N1) sollten auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Oseltamivir *in vivo* getestet werden. Generell stellen Mäuse das am häufigsten verwendete Tiermodell für die Influenza dar.¹⁹⁰ Für antivirale Untersuchungen mit den o. g. Isolaten bedurfte es zunächst der Etablierung eines Mausmodells zur Infektion weiblicher BALB/c-Mäuse mit diesen Viren.

Zusätzlich ermöglichte die Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Dürrwald (IDT Biologika GmbH Dessau-Roßlau) im Rahmen des BMBF-geförderten *FluResearchNet* die Testung der Oseltamivirempfindlichkeit eines porcinen Isolates im Schwein. Somit konnte der therapeutische Effekt dieses NA-Hemmers auf eine A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2)-Infektion in der Maus und im natürlichen Wirt verglichen werden.

Nachweis spezifischer Sialinsäurereste auf den Wirtszelloberflächen

In Hinblick auf die *In vivo*-Untersuchungen in BALB/c-Mäusen und Schweinen sollte die Verteilung NeuAc α 2,3Gal- bzw. NeuAc α 2,6Gal-verknüpfter Sialinsäurerezeptoren auf den Zellen des oberen (Trachea) bzw. unteren Respirationstrakts (Lunge) mithilfe der immunhistochemischen Färbung auf formalinfixiertem Gewebeschnitten analysiert werden.

Bei beiden Versuchstieren konnten sowohl α 2,3- als auch α 2,6-verknüpfte Sialinsäurereste in den Lungen und Tracheen nachgewiesen werden (Abbildung 10). Unterschiede gab es hinsichtlich der Expressionsmuster. So sind auf den Zilienzellen des murinen Tracheaepithels hauptsächlich α 2,3-verknüpfte Rezeptoren lokalisiert, wohingegen nur vereinzelte NeuAc α 2,6Gal-Reste auf diesen Zellen nachgewiesen werden konnten. In den tieferen Atemwegsgeweben der Mäuse sind die α 2,3-Rezeptoren fokal sowohl auf zilienhaltigen als auch auf zilienlosen Zellen der Bronchien und Bronchiolen lokalisiert sowie diffus über das Lungenparenchym verteilt. Deutlich weniger α 2,6-verknüpfte Sialinsäurereste konnten im unteren Respirationstrakt dieser Tiere nachgewiesen werden.

In der Schweinetrachea wurden vor allem NeuAc α 2,6Gal-Reste auf den Zilienzellen und α 2,3-Verknüpfungen in den basalen Gewebestrukturen detektiert. Beide Rezeptortypen werden auf den Bronchien dieser Tiere exprimiert und konnten diffus verteilt über das Lungenparenchym nachgewiesen werden.

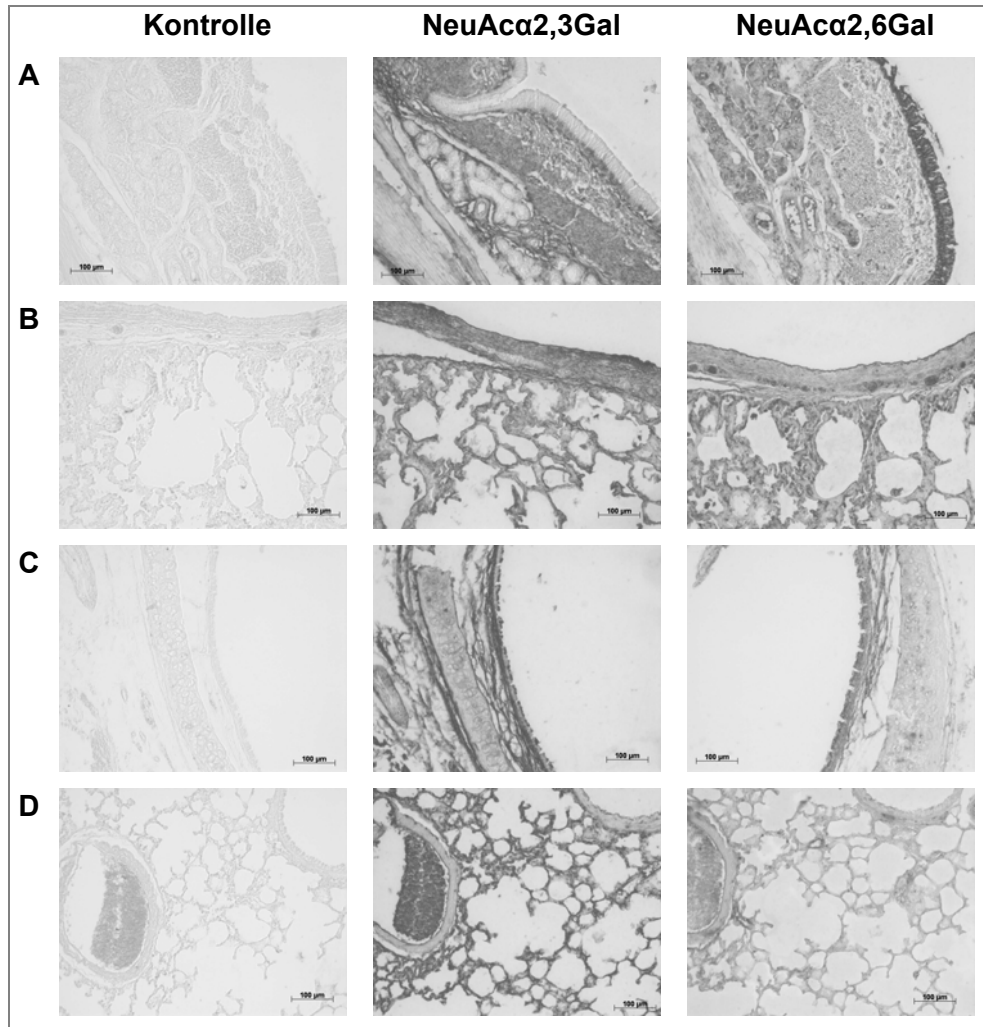


Abbildung 10: Bilder des immunhistochemischen Nachweis $\alpha 2,3$ - bzw. $\alpha 2,6$ -verknüpfter Sialinsäurereste im oberen (Trachea; A, C) sowie unteren Respirationstrakt (Lunge; B, D) von Schweinen (A, B) und weiblichen BALB/c-Mäusen (C, D) mit den Lektinen aus dem DIG Glycan Differentiation Kit von Roche bei 20facher Vergrößerung.

6.3.1 Etablierung eines Mausmodells zur Infektion weiblicher BALB/c-Mäuse mit humanen und porzinen Influenza-A-Viren des Subtyps H1

Zunächst sollte die Pathogenität von A/New Caledonia/20/99 (H1N1) und den beiden swFLUAV A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ und A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2) untersucht werden. Aus Versuchen zur intranasalen Inokulation 6 – 8 Wochen alter weiblicher BALB/c-Mäuse mit A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) in einer Dosis 10^4 TCID₅₀/20 µl war bekannt, dass die Infektion binnen der ersten vier Tage zur Ausbildung deutlicher Krankheitssymptome einhergehend mit starkem Körpergewichtsverlust und hohen Virustitern in den Lungen und Tracheen führt. Die mit den o. g. Isolaten mit 10^4 TCID₅₀/20

µl intranasal infizierten Mäuse wurden über einen Zeitraum von vier Tagen beobachtet, an denen täglich das Körpergewicht sowie das Allgemeinbefinden protokolliert und die Viruslast in den Lungen und Tracheen an den Tagen 2 und 4 p. i. bestimmt wurden. Die erhobenen Parameter sind in Tabelle 28 zusammengefasst. Die Infektion hatte bei allen drei Viren keinen bzw. nur einen sehr geringen Einfluss auf das Körpergewicht der infizierten Mäuse. Die Tiere wurden nicht in ihrem Allgemeinbefinden beeinträchtigt, obwohl sich die FLUAV sowohl in den Lungen als auch in den Tracheen effizient replizierten. Aus den Lungen der infizierten Mäuse isoliertes Virus (1. Viruspassage) wurde in MDCK-Zellen vermehrt und erneut zur Infektion von Mäusen eingesetzt. Diese Passagierung hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die Pathogenität der FLUAV, gemessen am Körpergewichtsverlust und den Krankheitssymptomen (Tabelle 28).

Tabelle 28: Parameter zur Beurteilung des Infektionserfolges weiblicher BALB/c-Mäuse nach intranasaler Infektion mit A/New Caledonia/20/99 (H1N1; NC20/99), A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ (Belz2/01-„Berlin“) bzw. A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2; Bak1832/00) mit 10^4 TCID₅₀/20 µl. Zusammengefasst sind die Ergebnisse der mit dieser Infektionsdosis durchgeführten zwei Mauspassagen.

Parameter	NC20/99	Belz2/01-„Berlin“	Bak1832/00
<u>1. Mauspassage</u>			
Körpergewicht [%]^a	+ 2	- 5	± 0
klinischer Befund^b	0	0	0
Virustiter^c			
- Lunge Tag 2 p. i.	3,27 ± 1,95	5,11 ± 0,37	4,40 ± 0,49
- Lunge Tag 4 p. i.	3,50 ± 0,14	4,23 ± 0,33	3,59 ± 0,68
- Trachea Tag 2 p. i.	1,73 ± 1,20	2,13 ± 1,26	2,73 ± 0,38
- Trachea Tag 4 p. i.	0,43 ± 0,65	0,13 ± 0,30	0,15 ± 0,30
<u>2. Mauspassage</u>			
Körpergewicht [%]^a	+ 0,6	- 5	± 0
klinischer Befund^b	0	0	0
Virustiter^c			
- Lunge Tag 2 p. i.	2,73 ± 1,60	5,34 ± 0,52	3,04 ± 0,32
- Lunge Tag 4 p. i.	2,97 ± 0,47	4,62 ± 0,61	3,50 ± 0,50
- Trachea Tag 2 p. i.	1,44 ± 1,37	3,81 ± 0,38	2,54 ± 0,16
- Trachea Tag 4 p. i.	0	0,67 ± 0,62	0

^a durchschnittliche prozentuale Körpergewichtsveränderung am Tag 4 p. i. im Vergleich zum Infektionstag; ^b entsprechend dem Bewertungsschema in Tabelle 13; ^c Titer [\log_{10} TCID₅₀/50 µl] einer 10%igen Lungen- bzw. 2%igen Tracheasuspension

Da die FLUAV in der eingesetzten Infektionsdosis von 10^4 TCID₅₀/20 µl nahezu keine Veränderungen im Körpergewicht und dem Allgemeinbefinden der infizierten Tiere induzierten, sollte nachfolgend der Einfluss der Virusdosis auf den Infektionsverlauf und die Pathogenität der swFLUAV in der Maus untersucht werden.

Dafür wurde erneut zunächst eine MDCK-Zellkulturpassage mit aus der Lunge der infizierten Tiere isoliertem Virus durchgeführt und die Virustiter durch Titration in MDCK-Zellen bestimmt. Die intranasale Infektion der Mäuse mit dem Virus der zweiten Mauspassage/MDCK erfolgte bei A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ mit Viruskonzentrationen von 10^4 und 10^5 TCID₅₀/20 µl und im Falle von A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2) mit 10^4 , 10^5 bzw. 10^6 TCID₅₀/20 µl. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von vier Tagen beobachtet und i) der Körpergewichtsverlauf und ii) das Allgemeinbefinden sowie iii) die Virustiter in den Lungen und Tracheen an den Tagen 2 und 4 p. i. als Parameter zur Beurteilung des Infektionserfolges ermittelt. Zusätzlich wurden iv) das Lungengewicht und v) die pathologischen Befunde von Lungenbiopsaten untersucht.

Über den gesamten Versuchszeitraum von vier Tagen stieg das Körpergewicht der scheininfizierten Kontrolltiere kontinuierlich an, während die mit dem swH1N1-Stamm infizierten Mäuse beider Dosisgruppen bis zum Tag 3 p. i. ~ 7 % ihres Ausgangsgewichtes verloren. Durch Steigerung der Infektionsdosis des swH1N2-Isolates konnten deutlichere Körpergewichtsverluste der Tiere erzielt werden. So resultierte die Infektion mit 10^6 TCID₅₀/20 µl in einer signifikanten Körpergewichtsreduktion von 12,24 % am Tag 3 p. i. ($p < 0,05$). Das Allgemeinbefinden der swH1N2-infizierten Tiere verschlechterte sich mit steigender Infektionsdosis. Im Infektionsverlauf ließ sich in der Gruppe der höchsten Inokulationsdosis zunächst struppiges Fell in der Nackenregion und dann später auf dem gesamten Körper beobachten. Hingegen hatte die swH1N1-Infektion keine Verschlechterung des Allgemeinbefindens der Tiere zur Folge (Daten nicht dargestellt).

In Tabelle 29 sind die Virustiter in den Lungen und Tracheen der A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“- bzw. A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2)-infizierten Tiere an den Tagen 2 und 4 p. i. zusammengefasst. Mit Erhöhung der Infektionsdosis von 10^4 auf 10^5 bzw. 10^6 TCID₅₀/20 µl stieg die Viruslast in den Lungen der swH1N2-infizierten Tiere am Tag 4 nach der Inokulation signifikant ($p < 0,05$) an, während kein dosisabhängiger Einfluss auf die Virustiter in den Tracheen zu verzeichnen war. Bei der Infektion mit dem swH1N1-Stamm konnte durch die höhere Infektionsdosis eine tendenziell signifikante ($p = 0,057$) Steigerung der Viruslast in den Lungen am Tag 4 p. i. induziert werden.

Ergebnisse

Tabelle 29: Einfluss der Infektionsdosis auf die Virustiter in Lunge (10%ig) und Trachea (2%ig) am Tag 2 und 4 nach der Infektion weiblicher BALB/c-Mäuse mit A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ bzw. A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2) mit dem Virus der zweiten Mauspassage/MDCK.

Infektionsdosis [TCID ₅₀ /20 µl]	log ₁₀ TCID ₅₀ /50 µl			
	Lunge		Trachea	
	Tag 2 p. i.	Tag 4 p. i.	Tag 2 p. i.	Tag 4 p. i.
H1N1 10 ⁴	4,79 ± 1,25	3,30 ± 1,89	2,59 ± 1,16	1,10 ± 1,13
H1N1 10 ⁵	5,17 ± 1,11	4,31 ± 1,18	3,54 ± 0,66	0,15 ± 0,30
p (10 ⁴ /10 ⁵)	0,316	0,057	0,065	0,063
H1N2 10 ⁴	2,42 ± 2,42	0,83 ± 1,67	2,57 ± 1,76	0,17 ± 0,34
H1N2 10 ⁵	4,96 ± 0,28	3,72 ± 0,75	3,00 ± 0,88	0,45 ± 0,39
H1N2 10 ⁶	4,08 ± 1,07	4,12 ± 0,25	1,74 ± 0,96	0,54 ± 0,71
p (10 ⁴ /10 ⁵)	0,063	0,016	0,344	0,187
p (10 ⁴ /10 ⁶)	0,138	0,014	0,226	0,196
p (10 ⁵ /10 ⁶)	0,099	0,229	0,068	0,415

Sowohl die swH1N1- als auch die swH1N2-Infektion hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Lungengewichte der infizierten Tiere an den Sektionstagen. Am Tag 4 p. i. war eine Gewichtsteigerung von ~ 13 bzw. ~ 22 % im Vergleich zu den Lungen der scheininfizierten Kontrolltiere ($p < 0,001$) zu verzeichnen (Ergebnisse nicht dargestellt). Die lichtmikroskopische Auswertung der HE-gefärbten Lungenschnitte ergab bei beiden Inokulationsviren sowohl zwischen den Infektionsdosen als auch im Vergleich der Sektionstage keine signifikant unterschiedliche histopathologische Veränderungen (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der geringen Pathogenität des swH1N1-Stammes A/swine/Belzig/2/01-„Berlin“ wurde ein aus der Lunge eines infizierten Tieres isoliertes Virus nochmals über MDCK-Zellen vermehrt, der Virustiter durch Titration in diesen Zellen bestimmt und der Einfluss einer Infektion mit 10⁵ TCID₅₀/20 µl auf drei weitere weibliche BALB/c-Mäuse untersucht. Diese zusätzliche dritte Mauspassage führte am Tag 4 p. i. zu i) einem durchschnittlichen Körpergewichtsverlust der infizierten Tiere von 15,4 ± 4,4 %, ii) einer Zunahme des Lungengewichts von ~ 40 % im Vergleich zu den nichtinfizierten Kontrolltieren sowie iii) zu einer Viruslast von 3,72 ± 1,95 bzw. 0,61 ± 0,53 log₁₀ TCID₅₀/50 µl in den Lungen (10%ig) bzw. Tracheen (2%ig) der inokulierten Mäuse (Daten nicht dargestellt).

Die Erfahrungen aus diesen Analysen zur Pathogenität der FLUAV in 6 – 8 Wochen alten weiblichen BALB/c-Mäusen führten dazu, dass für die nachfolgenden Untersuchungen mit

A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“ und dem huFLUAV A/Berlin/60/05 (H1N1) der Versuchsaufbau umgestellt wurde.

Die Infektion von jeweils zehn Mäusen erfolgte intranasal mit Viruskonzentrationen von 10^5 und 10^6 TCID₅₀/20 µl des swFLUAV und 10^4 , 10^5 bzw. 10^6 TCID₅₀/20 µl des huFLUAV. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 21 Tagen beobachtet, in denen in den ersten sieben Tagen täglich und anschließend alle zwei bis drei Tage das Körpergewicht sowie das Allgemeinbefinden protokolliert wurden. Bei den Sektionen an den Tagen 4 und 21 p. i. erfolgte die aseptische Entnahme von Blut, Lungen und Tracheen. Der Infektionserfolg wurde anhand der Parameter i) Körpergewichtsverlauf, ii) Allgemeinbefinden der Tiere, iii) Virustiter der Lungen und Tracheen am Tag 4 p. i. sowie iv) HI-AK-Titer am Tag 21 p. i. beurteilt. Weiterhin wurden v) das Lungengewicht und vi) die pathologischen Befunde von Lungenbiopsaten an den Tagen 4 und 21 p. i. erfasst.

In Abbildung 11 sind die prozentualen Körpergewichtsveränderungen der Versuchsgruppen in Bezug zum Infektionstag dargestellt.

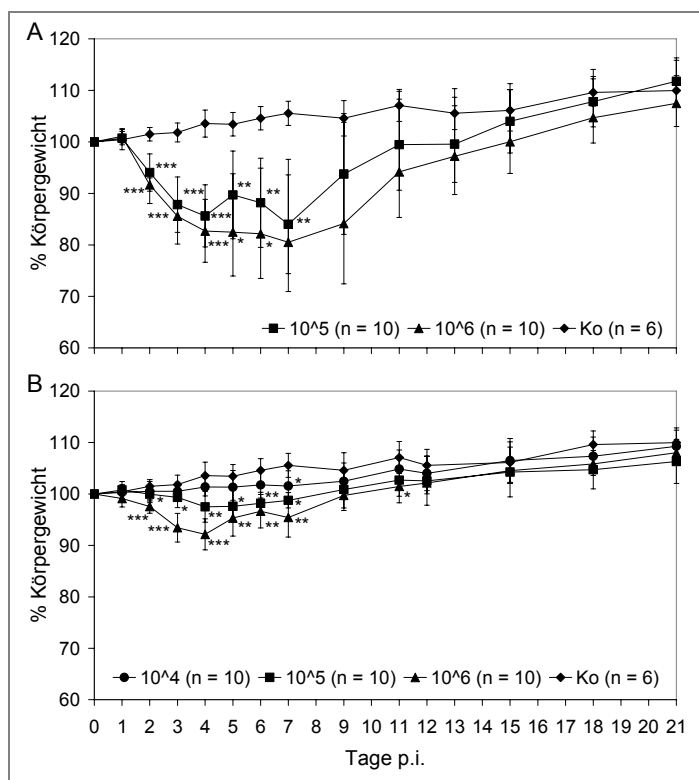


Abbildung 11: Gewichtsverlauf nach intranasaler Infektion weiblicher BALB/c-Mäuse mit 10^5 bzw. 10^6 TCID₅₀/20 µl A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“ (A) und mit 10^4 , 10^5 bzw. 10^6 TCID₅₀/20 µl A/Berlin/60/05 (H1N1; B). Dargestellt ist das mittlere prozentuale Körpergewicht zum Infektionstag. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ zu scheininfizierten Kontrolltieren (Ko).

Ein kontinuierlicher Gewichtsanstieg war in den scheininfizierten Kontrolltieren sowie in der mit 10^4 TCID₅₀/20 µl A/Berlin/60/05 (H1N1)-infizierten Gruppe über den gesamten Versuchszeitraum von 21 Tagen zu verzeichnen, wobei die Kontrolltiere schneller an Gewicht zunahmen als die virusinfizierten Mäuse. Die Tiere der mit 10^5 bzw. 10^6 TCID₅₀/20 µl infizierten Gruppen verloren nach der Infektion mit dem swFLUAV innerhalb

der ersten sieben Tage p. i. ~ 16 bzw. $\sim 19,5$ % ihres Körpergewichts. An den nachfolgenden Tagen war wieder eine Gewichtszunahme zu verzeichnen. Zwischen diesen beiden Infektionsdosen gab es signifikante Unterschiede im mittleren Körpergewicht virusinfizierter Mäuse im Vergleich zu den scheininfizierten Kontrolltieren an den Tagen 2 bis 7 bzw. 6 p. i. Die mit dem huFLUAV in Dosen von 10^5 bzw. 10^6 TCID₅₀/20 μ l infizierten Mäuse verloren innerhalb der ersten 4 Tage p. i. $\sim 2,5$ bzw. $\sim 4,7$ % ihres Körpergewichts bevor ab Tag 5 p. i. wieder ein Anstieg zu beobachten war. Im Versuchszeitraum kam es bei beiden Infektionsdosen zu signifikanten Unterschieden im mittleren Körpergewicht virusinfizierter Mäuse im Vergleich zu den scheininfizierten Kontrolltieren an den Tagen 2 bis 7 p. i.

Die swH1N1-Infektion führte bei beiden Infektionsdosen innerhalb der ersten zwei Versuchstage zur Ausbildung klinischer Symptome, die zwischen dem 4. und 7. Tag p. i. am stärksten ausgeprägt waren (Daten nicht dargestellt). Die erkrankten Mäuse bekamen struppiges Fell und bildeten einen starken Buckel aus. Sie waren apathisch, hatten teilweise geschlossene Augen und eine reduzierte Atmung. Die mit 10^5 TCID₅₀/20 μ l infizierten Tiere waren $8,2 \pm 1,8$ und die mit 10^6 TCID₅₀/20 μ l inokulierten Mäuse $8,7 \pm 2,5$ Tage erkrankt. Im Gegensatz dazu verlief die A/Berlin/60/05 (H1N1)-Infektion sehr mild (Daten nicht dargestellt). Die mit der höchsten Dosis infizierten Tiere entwickelten lediglich ein struppiges Nackenhaar und waren in ihren Bewegungsabläufen in keinerlei Hinsicht beeinträchtigt.

In Tabelle 30 sind weitere Parameter zur Beurteilung des Infektionserfolges zusammengefasst. So wirkte sich die Steigerung der Infektionsdosis bei beiden Viren hochsignifikant ($p < 0,01$) auf das Lungengewicht der Tiere am Tag 4 p. i. aus. Ein signifikanter Einfluss der Infektionsdosis auf die Viruslast in den Lungen am Tag 4 p. i. konnte nur bei dem huFLUAV verzeichnet werden, während sich die Virustiter in den Tracheen zu diesem Zeitpunkt nur geringfügig unterschieden. Im Gegensatz dazu hatte die steigende Infektionsdosis bei der A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“-Infektion keinen Einfluss auf die Viruslast in den Organen sowie den HI-AK-Titer am Tag 21 p. i. Die Erhöhung der Inokulationsmenge von 10^4 auf 10^5 bzw. 10^6 TCID₅₀/20 μ l führte bei der huFLUAV-Infektion zu signifikanten Anstiegen in den HI-AK-Titern 21 Tage p. i. während das porcine Isolat in beiden Infektionsgruppen ähnlich hohe Antikörpertiter induzierte.

Tabelle 30: Parameter zur Beurteilung des Infektionserfolges weiblicher BALB/c-Mäuse nach intranasaler Inokulation mit A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“ und A/Berlin/60/05 (H1N1) im Vergleich zu scheininfizierten Kontrolltieren (Ko).

Infektionsdosis [TCID ₅₀ /20 µl]	LG ^a [g]		log ₁₀ TCID ₅₀ /50 µl ^b		HI-AK ^c
	Tag 4 p. i.	Tag 21 p. i.	Lunge	Trachea	Tag 21 p. i.
Ko	0,12 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0	0	0
swH1N1 10⁵	0,18 ± 0,03	0,21 ± 0,06	3,25 ± 0,49	1,03 ± 0,70	240 ± 113
swH1N1 10⁶	0,23 ± 0,03	0,22 ± 0,06	3,60 ± 0,37	1,60 ± 0,63	240 ± 92
p (10⁵/10⁶)	0,009	0,439	0,117	0,108	0,500
huH1N1 10⁴	0,12 ± 0,09	0,17 ± 0,01	0,70 ± 1,57	0,97 ± 1,00	512 ± 175
huH1N1 10⁵	0,14 ± 0,01	0,17 ± 0,01	3,63 ± 0,22	0,67 ± 0,62	960 ± 453
huH1N1 10⁶	0,15 ± 0,01	0,17 ± 0,02	2,18 ± 1,26	0,77 ± 1,62	1280 ± 0
p (10⁴/10⁵)	0,003	0,457	0,007	0,294	0,046
p (10⁴/10⁶)	0,006	0,487	0,021	0,497	0,001
p (10⁵/10⁶)	0,417	0,461	0,004	0,325	0,095

^a Lungengewicht, ^b Virustiter in Lunge (10%ig) und Trachea (2%ig) am Tag 4 p. i., ^c Titer hämagglutinationsinhibierender Antikörper

Die HE-gefärbten Lungenschnitten wiesen bei beiden FLUAV keine signifikanten Unterschiede in den histopathologischen Befunden der Infektionsdosen auf (Daten nicht dargestellt).

Um mögliche Adaptationen der Viren an den Wirt auszuschließen, wurden im Anschluss an diese Untersuchungen zur Pathogenität stichprobenartig (n = 3) die RNA aus virusinfizierten Lungen isoliert und die Genomsegmente der Oberflächenproteine HA und NA sequenziert. Unterschiede zu den AS-Sequenzen der Ursprungsviren konnten nicht ermittelt werden (Daten nicht dargestellt).

Im Ergebnis dieser Untersuchungen zur Pathogenität humaner und porziner FLUAV in weiblichen BALB/c-Mäusen ließ sich Folgendes feststellen:

- i) Die huH1N1-FLUAV A/New Caledonia/20/99 und A/Berlin/60/05 induzierten einen geringen Körpergewichtsverlust und riefen eine sehr schwache klinische Symptomatik in weiblichen BALB/c-Mäusen hervor.
- ii) A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2) ist für die Mäuse gering pathogen. Nur die Infektion mit 10⁶ TCID₅₀/20 µl führte zu ~ 15 % Körpergewichtsverlusten und einer milden Symptomatik in den inokulierten Tieren.

- iii) Die A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-Isolate „Berlin“ und „Dessau“ sind für die Versuchstiere hoch pathogen. Sie unterscheiden sich nicht in Bezug auf die untersuchten Parameter (Tabelle 31).

Tabelle 31: Vergleich der Pathogenität von A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ und -„Dessau“ in weiblichen BALB/c-Mäusen nach intranasaler Infektion mit 10^5 TCID₅₀/20 µl.

Parameter	A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-	
	„Berlin“	„Dessau“
Körpergewicht^a	- 21,9 % (7)	- 21,9 % (7)
Letalität	~ 30 %	~ 10 %
MDD^b	6,50 ± 0,58	7
klinischer Befund	5 – 6	5 – 6
Lungengewicht^c (Tag 21 p. i.)	+ 56 %	+ 63 %
Lungenhistologie (Tag 21 p. i.)	2,50 ± 1,00	2,56 ± 0,88
Lungentiter^d (Tag 4 p. i.)	4,64 ± 0,61	4,93 ± 0,28

^a durchschnittlicher Körpergewichtsverlust im Vergleich zum Infektionstag, der Zeitpunkt mit dem höchsten Verlust ist in Klammern angegeben (Tag p. i.); ^b durchschnittlicher Todestag (*mean day to death*); ^c durchschnittliche Gewichtszunahme im Vergleich zu nichtinfizierten Kontrolltieren; ^d Titer [\log_{10} TCID₅₀/50 µl] einer 10%igen Suspension

Resultierend aus den Versuchen zur Pathogenität der Viren in weiblichen BALB/c Mäusen wurde auf die antivirale Testung von Oseltamivir gegen die huH1N1-FLUAV A/New Caledonia/20/99 und A/Berlin/60/05 *in vivo* aufgrund der geringen virusinduzierten Körpergewichtsverluste und sehr schwachen klinischen Symptomatik verzichtet. Aus Literaturangaben¹⁹¹⁻¹⁹³ und Erfahrungen bei der Oseltamivirtestung gegen A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) im Mausmodell war bekannt, dass u. a. gerade diese beiden Parameter als wichtiges Kriterium für den Therapieerfolg herangezogen werden.

Für die nachfolgenden vergleichenden Untersuchungen zum therapeutischen Effekt von Oseltamivir in diesem Tiermodell wurde für die beiden A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-Isolate „Berlin“ und „Dessau“ eine Infektionsdosis von 10^5 TCID₅₀/20 µl und für das swH1N2-FLUAV A/swine/Bakum/1832/00 von 10^6 TCID₅₀/20 µl ausgewählt. Zum einen induzierten die Infektionen mit diesen Dosen bei beiden Subtypen eindeutige Krankheitssymptome und die Körpergewichte der infizierten Tiere konnten deutlich reduziert werden. Zum anderen führten die Infektionen zu einer hohen Viruslast in den Lungen und Tracheen. Ein weiteres Auswahlkriterium lag im gleichmäßigen Infektionserfolg ohne größere Schwankungen in den einzelnen Parametern begründet.

6.3.2 Antivirale Behandlung A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“- bzw. „Dessau“-infizierter weiblicher BALB/c-Mäuse mit Oseltamivir

Für den Vergleich des Therapieerfolgs der mit den beiden A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-Isolaten infizierten weiblichen BALB/c-Mäuse mit dem NAI Oseltamivir wurden je Virusvariante 30 Tiere mit 10^5 TCID₅₀/20 µl intranasal mit dem Virus der ersten bzw. dritten Mauspassage/MDCK (A/swine/Belzig/2/01-„Dessau“ bzw. -„Berlin“) infiziert. Um bereits einen prophylaktischen Oseltamivireffekt zu erzielen, wurde mit der Substanzgabe 4 h vor der Virusinokulation begonnen. Bei insgesamt 15 Tieren pro Virusvariante erfolgte über einen Zeitraum von fünf Tagen zweimal täglich die orale Verabreichung der Substanz mit einer Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht/Tag. Die jeweils anderen 15 Mäuse je Virusvariante wurden mit NaCl placebobehandelt. Als Kontrollen dienten sechs scheininfizierte, placebobehandelte Tiere.

Der Einfluss der Oseltamivirbehandlung auf das Körpergewicht der Tiere ist in Abbildung 12 dargestellt. Während bei A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ signifikante Unterschiede ($p < 0,05$) im Körpergewichtsverlauf zwischen den Oseltamivir- bzw. placebobehandelten Tieren lediglich an den Tagen 5 und 6 p. i. festzustellen waren, führte die Substanzbehandlung bei A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“ zu signifikanten bzw. hochsignifikanten Differenzen ($p < 0,01$) an den Tagen 5 bis 10 p. i.

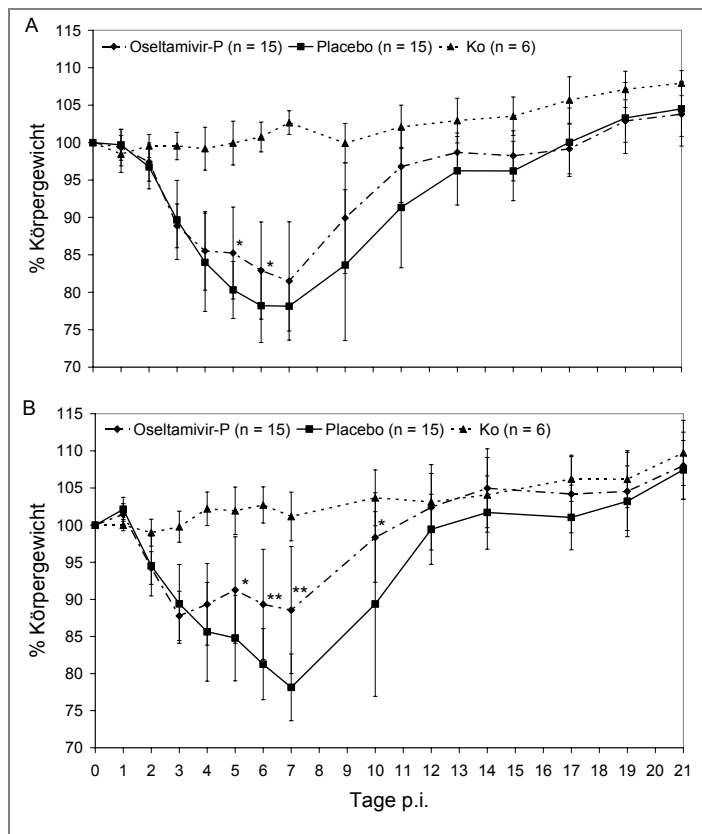


Abbildung 12: Einfluss der Oseltamivirbehandlung auf das Körpergewicht weiblicher BALB/c-Mäuse nach intranasaler Infektion mit A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ (A) und -„Dessau“ (B). Dargestellt ist die prozentuale Gewichtsentwicklung Oseltamivir- bzw. placebobehandelter infizierter Tiere zum Infektionstag im Vergleich zu scheininfizierten Kontrolltieren (Ko). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Die antivirale Therapie verbesserte das Allgemeinbefinden der Mäuse (Abbildung 13), wobei ebenfalls ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Isolaten zu verzeichnen war. Durch die Oseltamivirbehandlung wurde eine signifikante Verbesserung des Allgemeinbefindens der A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“-infizierten Tiere an den Tagen 5 ($p < 0,01$) und 7 p. i. ($p < 0,05$) erzielt. Bei den A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“-infizierten Mäusen konnte durch die Substanzgabe das klinische Bild der Tiere vom Tag 4 bis 10 p. i. höchstsignifikant ($p < 0,001$) verbessert werden.

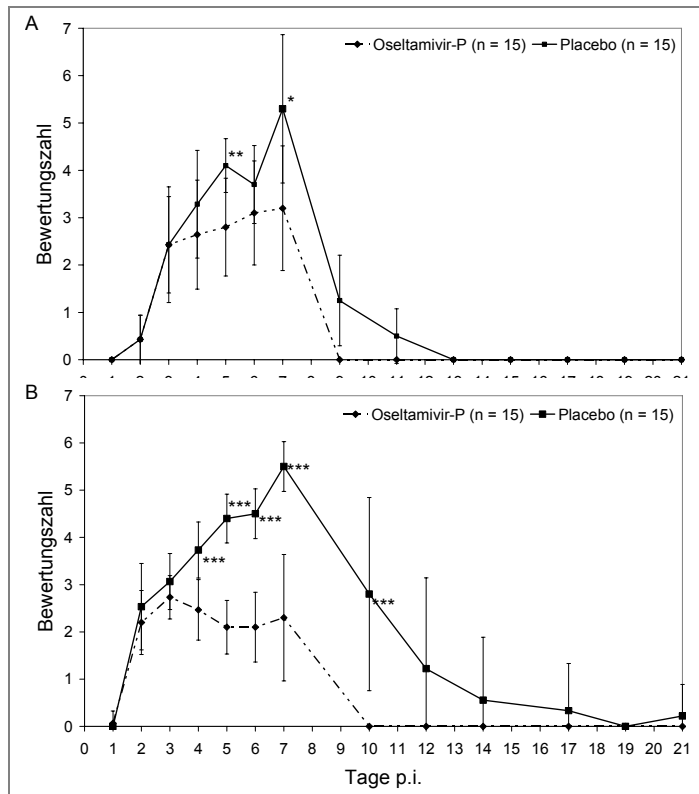


Abbildung 13: Einfluss der Oseltamivirbehandlung auf das Allgemeinbefinden weiblicher BALB/c-Mäuse nach intranasaler Infektion mit A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ (A) und -„Dessau“ (B). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Die Oseltamivirbehandlung reduzierte die Krankheitsdauer bei A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ von $11,5 \pm 1,91$ auf 9 ($p < 0,05$; Abbildung 14). Bei A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“ bewirkte die Substanz eine Verkürzung der klinischen Symptomatik von $13,38 \pm 1,77$ auf 10 Tage ($p < 0,01$).

Die Therapie verhinderte bei beiden Virusvarianten die Mortalität der Infektion. In den placebobehandelten Gruppen überlebten nach der Infektion mit A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ 71 % Tiere und bei A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“ 90 % der Mäuse bis zum Tag 21 p. i. Der durchschnittliche Todestag (*mean day to death*) lag dabei bei $6,50 \pm 0,58$ bzw. 7 Tagen p. i.

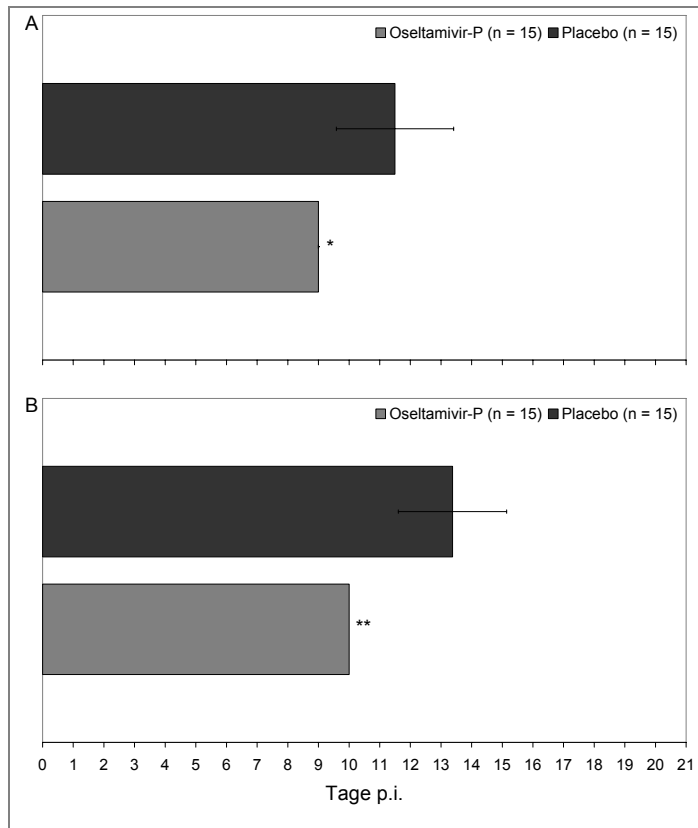


Abbildung 14: Einfluss der Oseltamivirbehandlung auf die Krankheitsdauer nach intranasaler Infektion weiblicher BALB/c-Mäuse mit A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ (A) und -„Dessau“ (B). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Als weitere Parameter zur Beurteilung des antiviralen Effektes von Oseltamivir in A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-infizierten weiblichen BALB/c-Mäusen wurden i) die Lungengewichte an den Sektionstagen erfasst, ii) die Virustiter der Lungen und Tracheen am Tag 4 p. i. ermittelt und iii) der Titer an HI-AK am Tag 21 p. i. bestimmt. Tabelle 32 gibt einen Überblick über diese Parameter.

Tabelle 32: Parameter zur Beurteilung der antiviralen Wirksamkeit von Oseltamivir-Phosphat in A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-infizierten weiblichen BALB/c-Mäusen im Vergleich zu scheininfizierten Kontrollmäusen (Ko).

A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-	LG [g] ^a		log ₁₀ TCID ₅₀ /50 µl ^b		HI-AK ^c
	Tag 4 p. i.	Tag 21 p. i.	Lunge	Trachea	Tag 21 p. i.
Ko	0,13 ± 0,01	0,14 ± 0,01	0	0	0
„Berlin“ Oseltamivir	0,18 ± 0,33	0,19 ± 0,16	4,08 ± 0,52	0,92 ± 0,32	288 ± 72
„Berlin“ Placebo	0,19 ± 0,54	0,20 ± 0,33	3,34 ± 0,61	1,75 ± 0,74	280 ± 80
„Dessau“ Oseltamivir	0,17 ± 0,09	0,21 ± 0,30	4,31 ± 0,34	1,46 ± 0,23	304 ± 140
„Dessau“ Placebo	0,20 ± 0,43	0,23 ± 0,35	4,93 ± 0,28	2,36 ± 0,66	320 ± 139
p „Berlin“	0,41	0,26	0,06	0,05	0,44
p „Dessau“	0,09	0,22	0,01	0,02	0,40

^a Lungengewicht, ^b Virustiter in Lunge (10%ig) und Trachea (2%ig) am Tag 4 p. i., ^c Titer hämagglutinationsinhibierender Antikörper

Bei beiden Isolaten bewirkte Oseltamivir sowohl am Tag 4 als auch am Tag 21 p. i. keine signifikante Reduktion in den Lungengewichten sowie im HI-AK-Titer am Tag 21 p. i. Ein Unterschied zwischen den Virusvarianten war allerdings in Bezug auf die Viruslast der Lungen und Tracheen am Tag 4 p. i. zu verzeichnen. Durch die Substanzbehandlung konnten die Virustiter in A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“-infizierten Tieren signifikant reduziert werden, während die Unterschiede bei der Infektion mit A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ nicht signifikant waren.

Die lichtmikroskopische Auswertung HE-gefärbter Lungenschnitte von Tag 21 p. i. ergab zwischen den beiden Virusvarianten keine Unterschiede bezüglich den virusinduzierten histologischen Veränderungen in den placebobehandelten Gruppen (Abbildung 15B und D). Im Vergleich dazu konnten durch die Oseltamivirbehandlung bei beiden Isolaten keine signifikanten Verbesserungen erzielt werden („Berlin“: $p = 0,901$; „Dessau“ $p = 0,072$). Dennoch wurden in den Lungen der substanzbehandelten, A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“-infizierten Tiere deutlich weniger Infiltrationen beobachtet (Abbildung 15F) als in der A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“-infizierten Vergleichsgruppe (Abbildung 15C).

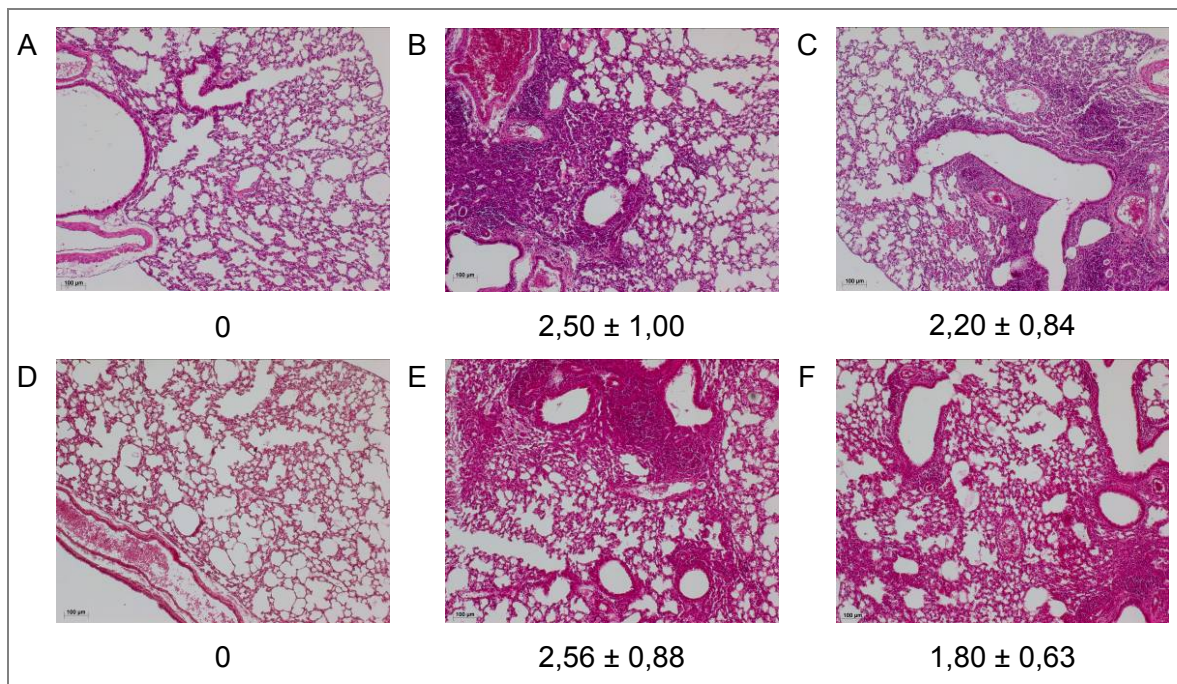


Abbildung 15: Bilder von HE-gefärbten Lungenschnitten scheininfizierter Kontrolltiere (A, D) sowie A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“- (B, C) und -„Dessau“-infizierter (E, F), placebo- (B, E) und Oseltamivir-behandelter (C, F) weiblicher BALB/c-Mäuse am Tag 21 p. i. bei 10facher Vergrößerung sowie Mittelwerte und Standardabweichungen der pathologischen Befunde.

Mittels *In situ*-Hybridisierung sollte in Kooperation mit Frau Prof. Klingel (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen) der Einfluss der Oseltamivirbehandlung auf die Virusausbreitung in den Lungen infizierter Tiere dargestellt werden. Sowohl nach Infektion mit dem „Berlin“- als auch dem „Dessau“-Stamm konnte in den placebobehandelten Gruppen virale RNA über die gesamte Lunge verteilt nachgewiesen werden. Oseltamivir-behandelte Lungenschnitte wiesen hingegen eine leicht verminderte Virusausbreitung, charakterisiert durch den Nachweis viraler RNA in der Nähe der Bronchien, auf (Abbildung 16).

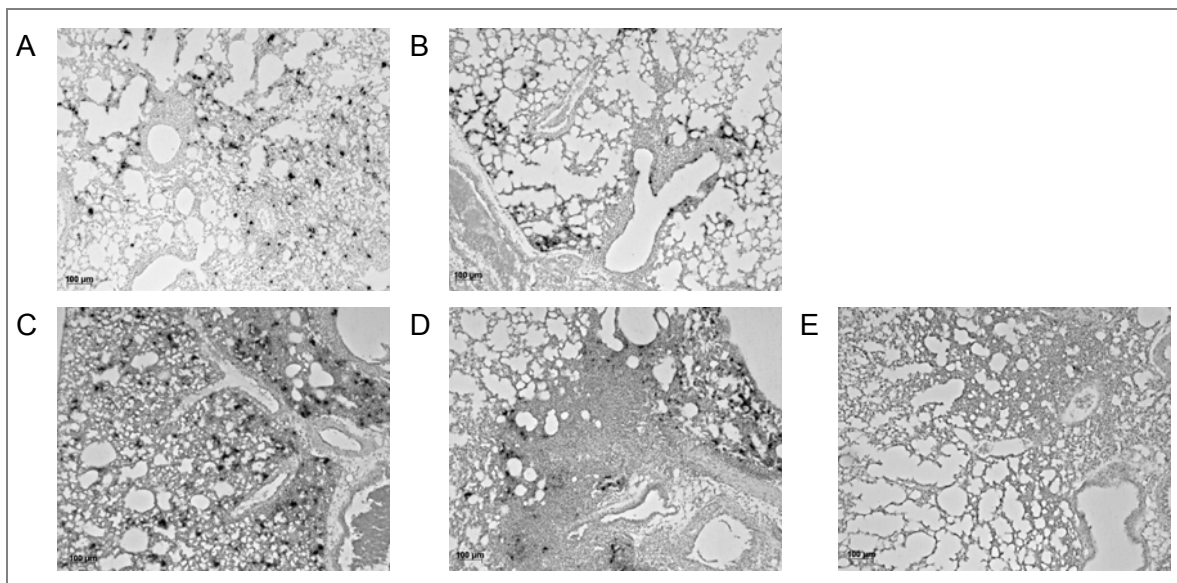


Abbildung 16: Bilder der *In situ*-Hybridisierung formalinfixierter Lungenschnitte A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“- (A, B) und -„Dessau“-infizierter (C, D), placebo- (A, C) und Oseltamivir-behandelter (B, D) weiblicher BALB/c-Mäuse am Tag 4 p. i. im Vergleich zu scheininfizierten Kontrollen (E) bei 10facher Vergrößerung.

6.3.3 Antivirale Therapie A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2)-infizierter weiblicher BALB/c-Mäuse mit Oseltamivir

Zur Untersuchung des antiviralen Effekts von Oseltamivir in A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2)-infizierten weiblichen BALB/c-Mäusen bekamen 30 Tiere das auf MDCK-Zellen vermehrte Virus der zweiten Mauspassage in einer Dosis von 10^6 TCID₅₀/20 µl intranasal inokuliert. Mit der Substanzgabe wurde 4 h vor der Infektion begonnen um bereits einen prophylaktischen Effekt des NA-Hemmers zu erzielen. Bei insgesamt 15 Tieren erfolgte über einen Zeitraum von sieben Tagen zweimal täglich die orale Verabreichung der Substanz. Dabei lag die Oseltamivirdosis bei 10 mg/kg Körpergewicht/Tag. Die anderen 15 Mäuse wurden nach dem gleichen Schema mit NaCl placebobehandelt. Als Kontrollen

dienten fünf scheininfizierte, placebobehandelte Tiere. Zur Beurteilung des antiviralen Effekts von Oseltamivir wurden die Mäuse über einen Zeitraum von 21 Tagen beobachtet. In den ersten sieben Tagen p. i. wurde täglich und anschließend alle zwei bis drei Tage das Allgemeinbefinden sowie das Körpergewicht der Tiere protokolliert. Bei den Sektionen an den Tagen 4, 7 und 21 p. i. erfolgte die aseptische Entnahme von Lungen und Tracheen sowie der Seren.

In Abbildung 17A ist die Entwicklung des Allgemeinbefindens der Tiere nach der Virusinokulation dargestellt. Die Infektion führte bei den Mäusen beider Gruppen innerhalb der ersten 4 Tage p. i. gleichermaßen zur Ausbildung klinischer Symptome, charakterisiert durch struppiges Fell und der Einnahme einer gebuckelten Körperhaltung. In den darauf folgenden Tagen verbesserte sich das klinische Bild in beiden Gruppen, wobei signifikante Unterschiede an den Tagen 6 und 7 p. i. beobachtet wurden. Zudem konnte bei den Oseltamivir-behandelten Tieren eine schnellere Genesung verzeichnet werden (Abbildung 17B). Die NAI-Gabe führte zu einer signifikanten Reduktion der Krankheitsdauer ($p < 0,05$) um 2,4 Tage.

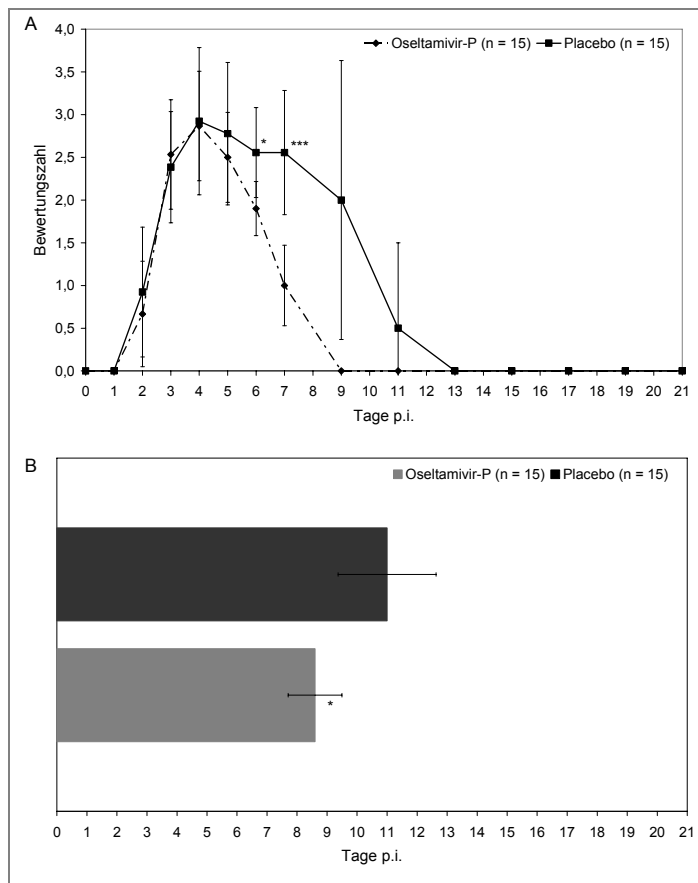


Abbildung 17: Einfluss der Oseltamivirbehandlung auf die klinischen Symptome (A) und die Dauer der Erkrankung (B) weiblicher BALB/c-Mäuse nach intranasaler A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2)-Infektion mit 10^6 TCID₅₀/20 µl. Dargestellt ist der Krankheitsverlauf in Oseltamivir- und placebobehandelten Tieren. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

Die A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2)-Infektion resultierte in einer Reduktion des Körpergewichts der Tiere auf maximal $85,37 \pm 5,34$ % bzw. $84,57 \pm 7,12$ % des

Ergebnisse

Ausgangsgewichts am Infektionstag in den Oseltamivir- bzw. Placebo-behandelten Gruppen am Tag 6 p. i., wobei über den gesamten Versuchsverlauf kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen beobachtet wurde (Daten nicht dargestellt). Als weitere Parameter zur Beurteilung des antiviralen Effektes von Oseltamivir in A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2)-infizierten weiblichen BALB/c-Mäusen wurden i) die Lungengewichte an den Sektionstagen erfasst, ii) die Virustiter der Lungen und Tracheen an den Tagen 4 und 7 p. i. ermittelt und iii) die HI-AK-Titer bestimmt. Tabelle 33 gibt einen Überblick über diese Parameter.

Tabelle 33: Übersicht über die Parameter zur Beurteilung der antiviralen Wirksamkeit von Oseltamivir-Phosphat in A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2)-infizierten weiblichen BALB/c-Mäusen im Vergleich zu scheininfizierten Kontrolltieren (Ko).

	LG [g] ^a			log ₁₀ TCID ₅₀ /50 µl ^b		HI-AK ^c
	Tag 4 p. i.	Tag 7 p.i	Tag 21 p. i.	Lunge	Trachea	Tag 21 p. i.
Ko	-	-	0,13 ± 0,02	0	0	0
Placebo	0,16 ± 0,04	0,22 ± 0,01	0,18 ± 0,03	3,58 ± 0,29	1,24 ± 0,87	240 ± 113
Oseltamivir	0,17 ± 0,02	0,22 ± 0,04	0,15 ± 0,02	3,19 ± 0,57	0,53 ± 0,87	256 ± 88
p	0,34	0,43	0,10	0,11	0,13	0,40

^a Lungengewicht, ^b Virustiter in Lunge (10%ig) und Trachea (2%ig) am Tag 4 p. i., ^c Titer hämagglutinationsinhibierender Antikörper

Am Tag 7 p. i. konnte nur in einer von fünf bzw. zwei von fünf Mäusen der Oseltamivir- bzw. Placebo-behandelten Gruppe infektiöses Virus in den Lungen nachgewiesen werden, während die Tracheen in beiden Gruppen virusfrei waren. Aus diesem Grund wird auf die Darstellung der Titer in Tabelle 33 verzichtet. Die Substanzbehandlung hatte weder einen signifikanten Einfluss auf das Lungengewicht der Mäuse noch auf die Viruslast in den Lungen und Tracheen am Tag 4 p. i. bzw. die HI-AK-Titer am 21. Tag p. i. Die lichtmikroskopische Auswertung HE-gefärbter Gewebeschnitte ergab keine signifikanten Unterschiede in den virusbedingten histologischen Veränderungen der Lungen an den Sektionstagen (Tag 4 p. i.: p = 0,548; Tag 7 p. i.: p = 0,548; Tag 21 p. i.: p = 0,847, Abbildung 18).

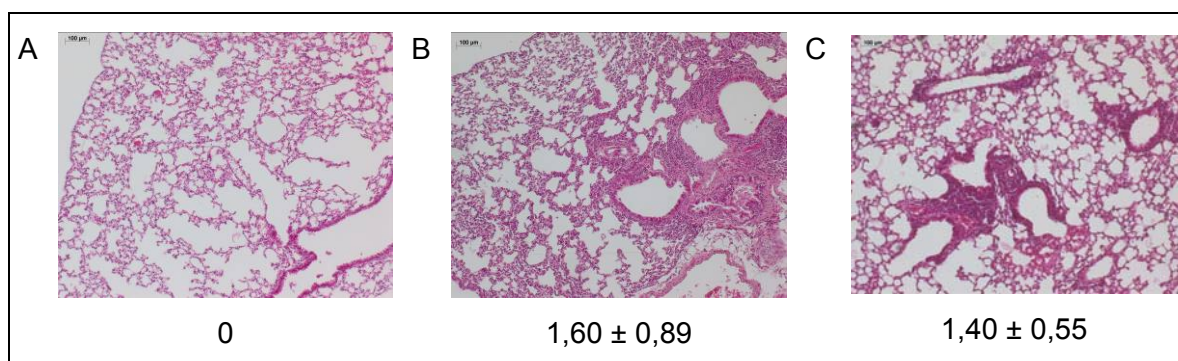


Abbildung 18: Bilder HE-gefärbter Lungschnitte von scheininfizierten Kontrolltieren (A) und Placebo- (B) bzw. Oseltamivir-behandelten (C) A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2)-infizierten weiblichen BALB/c-Mäusen am Tag 21 p. i. bei 10facher Vergrößerung sowie Mittelwerte und Standardabweichungen der pathologischen Befunde.

Stichprobenartig durchgeführte HA- und NA-Sequenzanalysen (n = 3) nach dieser erneuten Passage des Bakum-Stammes in der Mauslunge ergaben keine Veränderungen in diesen Oberflächenproteinen (Ergebnisse nicht dargestellt).

6.3.4 Antivirale Behandlung A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2)-infizierter Schweine mit Tamiflu®

Die antivirale Behandlung A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2)-infizierter elf Wochen alter Schweine mit Tamiflu® wurde von Herrn Dr. Dürrwald (IDT Biologika GmbH in Dessau-Roßlau) durchgeführt. Die Infektion erfolgte durch Vernebelung eines virushaltigen Aerosols. Um bereits einen prophylaktischen Effekt von Oseltamivir-Phosphat zu erzielen, begann die Substanzverabreichung mit zwei handelsüblichen Tamiflu®-Hartkapseln pro Tier der behandelten Gruppe bereits am Abend vor der Infektion. Insgesamt wurden zehn Tiere über einen Zeitraum von fünf Tagen zweimal täglich oral behandelt. Dabei lag die Oseltamivirdosis bei 150 mg/Tag entsprechend der in der Packungsbeilage empfohlenen Dosis für den Menschen. Zwölf unbehandelte, virusinfizierte Tiere wurden analog zu den behandelten Schweinen über einen Zeitraum von zehn Tagen beobachtet. Eine weitere Kontrollgruppe schloss zehn, vor der Infektion mit dem von der IDT Biologika GmbH entwickelten Schweineimpfstoff RESPIPORC FLU3 zweifach in einem Intervall von 21 Tagen (Beginn vier Wochen vor der Virusinokulation) immunisierte Tiere ein.

Bei den Schweinen hatte die Virusinfektion keinen Einfluss auf das Körpergewicht der Tiere (Daten nicht dargestellt). Sie führte in der unbehandelten Gruppe zu einem milden Krankheitsverlauf, gekennzeichnet durch eine kurze Krankheitsdauer von wenigen Tagen und schwachen respiratorischen Symptomen. Dennoch konnten in der akuten

Ergebnisse

Infektionsphase signifikante Unterschiede im Allgemeinbefinden zwischen diesen Tieren und den FLU3-immunisierten bzw. Tamiflu®-behandelten Schweinen beobachtet werden (Abbildung 19A). Während die Atmung der unbehandelten Schweine deutlich durch die Infektion beeinflusst wurde, waren sowohl die geimpften als auch die substanzbehandelten Tiere nahezu symptomfrei.

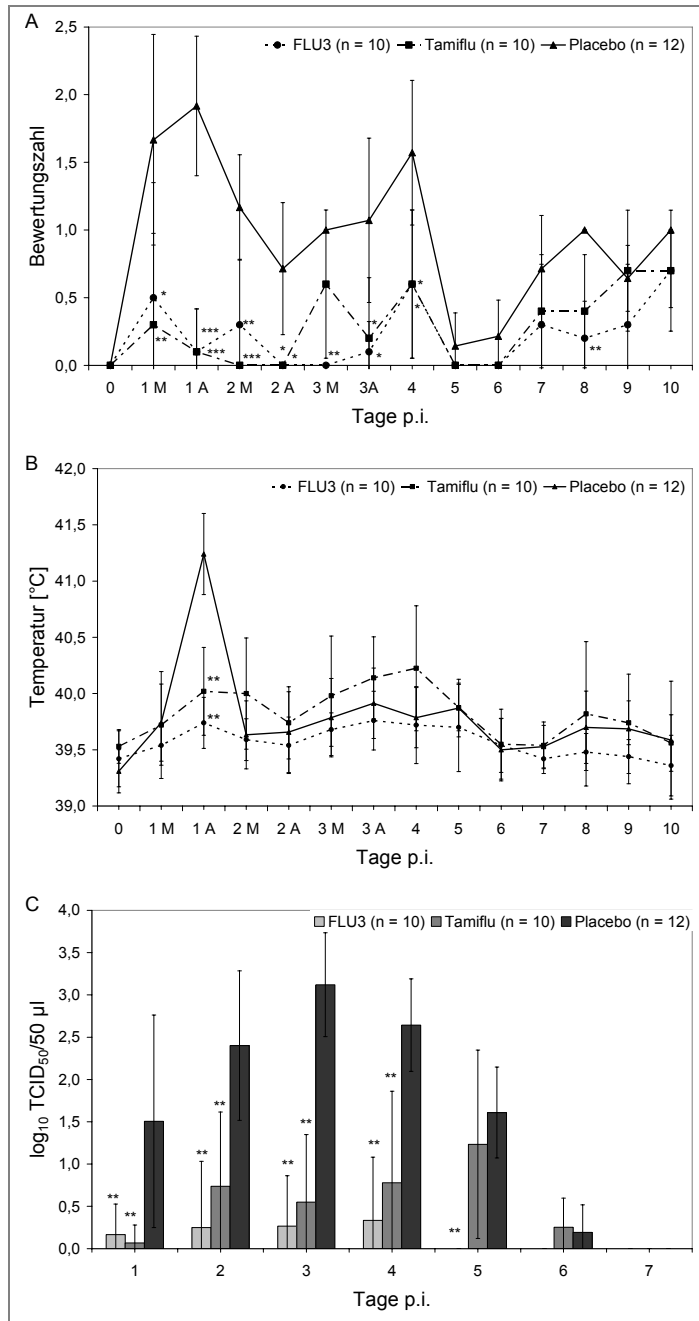


Abbildung 19: Einfluss der FLU3-Immunisierung sowie der Tamiflu®-behandlung A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2)-infizierter Schweine auf das Allgemeinbefinden (A), die rektale Körpertemperatur (B) und die durch Titration in MDCK-Zellen ermittelten Virustiter in Nasenspülflüssigkeiten (C). M morgens, A abends. * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Am Tag 1 p. i. war abends ein hochsignifikanter Unterschied ($p < 0,01$) in den mittleren Körpertemperaturen der drei Gruppen zu verzeichnen. Während die unbehandelten Tiere zu diesem Zeitpunkt Fieber ($> 41\text{ °C}$) entwickelten, blieb sowohl bei den immunisierten als auch bei den substanzbehandelten Schweinen die rektale Körpertemperatur über den gesamten Untersuchungszeitraum nahezu konstant bei $39 - 40\text{ °C}$ (Abbildung 19B).

Weiterhin reduzierte die Immunisierung bzw. Tamiflu®-Behandlung hochsignifikant ($p < 0,01$) die Virusausscheidung, gemessen am Virustiter in täglich durchgeführten Nasenspülungen (Abbildung 19C). In allen unbehandelten Schweinen wurden infektiöse Viren über einen Zeitraum von $6,29 \pm 0,49$ Tagen p. i. mittels Titration der Nasenspülflüssigkeiten in MDCK-Zellen nachgewiesen. Auch fand bei den Tamiflu®-behandelten Tieren über eine Zeitspanne von $5,20 \pm 2,95$ Tagen p. i. die Virusreplikation im Nasen-Rachenraum statt, jedoch mit hochsignifikant reduzierten Titern an den Tagen 1 – 4 p. i. In zwei von fünf Tamiflu®-behandelten Tieren konnte erst ab Tag 5 p. i., also nach Beendigung der Substanzgabe, infektiöses Virus in den Nasenspülflüssigkeiten nachgewiesen werden. Zwei weitere Schweine dieser Gruppe schieden von Tag 2 – 5 bzw. 6 p. i. Virus aus, während ein Tier im gesamten Untersuchungszeitraum vor einer Virusreplikation im oberen Respirationstrakt geschützt war. Die Impfung der Tiere mit FLU3 bewirkte keinen vollständigen Schutz vor einer Virusvermehrung im oberen Respirationstrakt, aber eine deutliche Reduktion ($p < 0,01$) der durchschnittlichen Virusausscheidungsdauer auf $0,70 \pm 1,64$ Tage p. i., wobei in nur zwei von zehn Tieren dieser Gruppe der Virusnachweis möglich war. Dabei schied ein Tier Virus in Konzentrationen zwischen $1 - 2,48 \log_{10} \text{TCID}_{50}/50\text{ }\mu\text{l}$ bis zum Tag 4 p. i. aus.

Aufschluss über eine mögliche Virusreplikation im unteren Respirationstrakt gab die Bestimmung der 50%igen Eiinfektionsdosis ($\text{EID}_{50}/10\text{ mg}$ Organgewicht) aus Homogenisaten beider Lungenflügel am Tag 2 p. i. (Tabelle 34). Während die FLU3-immunisierten Schweine komplett vor einer Virusausbreitung in die Lunge geschützt waren, konnte in den beiden anderen Gruppen in allen Tieren infektiöses Virus in beiden Lungenflügeln nachgewiesen werden. Die statistische Analyse ergab keine signifikanten Unterschiede in den Virustitern der Tamiflu®-behandelten und unbehandelten Tiere.

HE-gefärbte Lungensschnitte wurden lichtmikroskopisch ausgewertet. Während in FLU3-immunisierten Schweinen sowohl am Tag 2 als auch am Tag 10 p. i. nur mäßige histologische Veränderungen der Lunge beobachtet werden konnten ($p < 0,01$ im Vergleich zur unbehandelten Gruppe), gab es zu beiden Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Tamiflu®-behandelten und unbehandelten Tieren ($p = 0,42$ bzw. $0,07$). In beiden Gruppen waren broncholuminale Alveolarmakrophagen bei guter Erhaltung der Epithelzellen und markante interstitielle mononukleäre Infiltrate deutlich

Ergebnisse

erkennbar (Abbildung 24). Histologische Veränderungen in der Trachea konnten nicht festgestellt werden (nicht dargestellt).

Tabelle 34: Vergleich der Virustiter in Lungenhomogenisaten FLU3-immunisierter, Tamiflu®-behandelter bzw. unbehandelter Schweine am Tag 2 nach der intranasalen Infektion mit A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2) durch Virusvernebelung.

Behandlung	$\log_{10} \text{EID}_{50}/10 \text{ mg}^a$	
	linker Lungenflügel	rechter Lungenflügel
FLU3-immunisiert (n = 5)	0	0
Tamiflu®-behandelt (n = 5)	$1,18 \pm 0,27$	$1,70 \pm 0,62$
unbehandelt (n = 5)	$1,30 \pm 0,20$	$1,54 \pm 0,62$
p (FLU3/Tamiflu®)	< 0,01	< 0,01
p (FLU3/unbehandelt)	< 0,01	< 0,01
p (Tamiflu®/unbehandelt)	0,22	0,35

^a 50%ige Eiinfektionsdosis pro 10 mg Organgewicht

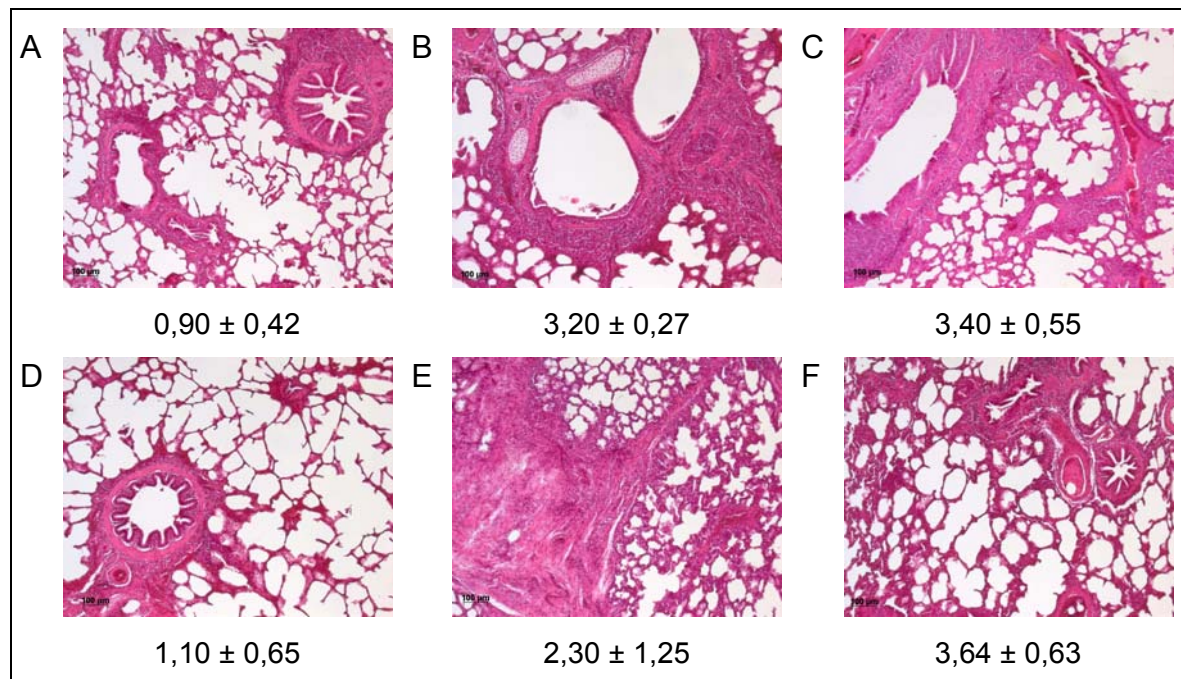


Abbildung 20: Bilder von HE-gefärbten Lungenschnitten FLU3-immunisierter (A, D), Tamiflu®-behandelter (B, E) und unbehandelter (C, F) Schweine nach intranasaler Infektion mit A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2) durch Virusvernebelung am Tag 2 (A-C) bzw. 10 p. i. (D-F) bei 10facher Vergrößerung sowie Mittelwerte und Standardabweichungen der pathologische Befunde.

7 Diskussion

Mit dem Auftreten der A/H1N1v-Pandemie wurde die Wichtigkeit einer kontinuierlichen Überwachung der swFLUAV u. a. in Bezug auf die Virustatikaempfindlichkeit deutlich. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden 31 humane und 74 porcine deutsche Isolate der Subtypen H1N1 und H1N2 untersucht. Ein Hauptaugenmerk lag dabei auf der Analyse der Empfindlichkeit gegen die derzeit existierenden Virustatika der beiden Wirkstoffklassen Adamantanamine und NA-Hemmer. Neben *In vitro*-Analysen in zellkultur- und enzymbasierten Testen wurden die Genomsegmente der Oberflächenglykoproteine HA und NA sowie das M-Protein sequenziert, auf AS-Substitutionen untersucht und die Befunde miteinander abgeglichen. Von grundlegender Bedeutung waren zudem Analysen zum Einfluss von AS-Austauschen in der Rezeptorbinderegion des HA und von potentiellen HA-Glykosylierungsstellen auf die NA-Empfindlichkeit. Ausgewählte Isolate wurden auf ihre Sensitivität gegenüber Oseltamivir *in vivo* untersucht. Dafür war es im Rahmen der vorliegenden Dissertation notwendig ein Mausmodell für antivirale Untersuchungen humaner und porciner FLUAV zu etablieren. Neben den Untersuchungen zur Oseltamivirtherapie in der Maus ermöglichte die Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Dürrwald (IDT Biologika GmbH, Dessau-Roßlau) im Rahmen des BMBF-geförderten *FluResearchNet* den Vergleich der antiviralen Empfindlichkeit eines H1N2-Isolats in der Maus und im natürlichen Wirt, dem Schwein.

7.1 Empfindlichkeit der Influenza-A-Viren gegenüber den existierenden Substanzklassen

Amantadin war die erste antiviral wirksame Substanz, die FLUAV durch eine Blockierung des M2-Ionenkanals und dem damit unterbundenen Virus-*Uncoating* inhibierte.¹⁹⁴

Weltweit wurde in den letzten Jahren eine starke Zunahme Amantadin-resistenter Viren verzeichnet.^{112, 115, 195} Die Amantadinresistenz steht direkt mit den Mutationen L26F, V27A, A30I, S31N und G34A in der Transmembrandomäne des viralen M2-Proteins in Zusammenhang.^{100, 105} Mittels Reverser Genetik bestätigten Abed *et al.*, dass diese AS-Substitutionen eine Resistenz hervorrufen und Ergebnisse von phänotypischen und genotypischen Untersuchungen zur Amantadinempfindlichkeit der Viren komplett übereinstimmen.¹⁰⁶ Zur schnelleren Analyse der Suszeptibilität der humanen und porcinen FLUAV wurde deshalb die Genotypisierung des M2-Proteins eingesetzt. Bei den humanen Isolaten wurden keine der resistenzbedingenden Substitutionen detektiert. Die Viren waren demnach sensitiv gegenüber den Adamantanaminen, was die zur Bestätigung der genotypischen Untersuchungen durchgeführten Plaquereduktionsteste

mit Amantadin in MDCK-Zellen belegten (Tabelle 17). Im Gegensatz dazu exprimierten alle porzinen Stämme die zwischen 1989 und 2006 isoliert wurden die S31N-Substitution im M2-Protein. Zusätzlich trugen acht swH1N1-FLUAV die V27A-Substitution. Im Plaquereduktionstest mit ausgewählten Viren konnten die resistenten Isolate selbst bei Einsatz einer mehr als 100fach höheren Amantadinkonzentrationen als bei den sensitiven Stämmen nicht inhibiert werden.

Eine Studie europäischer swFLUAV wies die Amantadinresistenz in Virusisolaten aller Subtypen, die ab 1989 isoliert wurden nach.¹⁷³ Phylogenetische Analysen der M-Genomsegmente dieser Stämme zusammen mit repräsentativen Sequenzen für die derzeit existierenden acht M-Genotypen A – G ergaben für alle europäischen swFLUAV eine eigene Clade im Genotyp F. Die Amantadinresistenz in der europäischen Schweinepopulation ist demnach durch ein einzelnes Ereignis entstanden bei dem die Amantadin-empfindlichen H1N1-Viren durch resistente Stämme ersetzt wurden. 1992 kam es durch Reassortierung zur Übertragung der Resistenz auf die swH3N2-Stämme. Durch ein erneutes Reassortierungsereignis dieser H3N2-Viren mit huH1N1-Isolaten entstanden die swH1N2-Isolate,¹⁸³ die demzufolge ebenfalls die Resistenz trugen. Der genaue Zeitpunkt der Resistenzentwicklung lässt sich nur schwer datieren, da nur sehr wenige Sequenzen aus dieser Zeit in der GenBank verfügbar sind. Wahrscheinlich ist jedoch, dass die S31N-Mutation etwa 1988 auftrat.¹⁷³ Obwohl in der Literatur Resistenzsubstitutionen an fünf AS-Positionen des M2-Proteins beschrieben sind, konnte bei der Analyse der swFLUAV in der vorliegenden Dissertation und auch in anderen Studien mit huFLUAV gezeigt werden, dass die S31N-Mutation am häufigsten vorkommt.¹⁹⁶ Auch der seit dem Jahr 2003 zu verzeichnende signifikante Anstieg der Amantadinresistenz bei den huH3N2-FLUAV ist durch diese Substitution bedingt.^{112-114, 195} Doch nicht nur bei den Isolaten dieses Subtyps sondern auch bei den huH1N1-FLUAV war Anfang des 21. Jahrhunderts eine Zunahme der Amantadinresistenz zu verzeichnen. Während alle im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersuchten huH1-Stämme sensitiv waren, wurden für andere geografische Regionen (Asien, Australien, Nordamerika, Osteuropa) erste Resistenzen in der Saison 2005/06 beschrieben.^{115, 117} Mit dem Auftreten des Pandemiestammes 2009 wurde der humane M2-Genotyp B durch die resistenten porzinen M-Segmente vom Genotyp F ersetzt.

Ein direkter Zusammenhang der generellen Amantadinresistenz in den deutschen und europäischen Schweinepopulationen bzw. eine Übertragung der Resistenz auf die humane Bevölkerung vor Ausbruch der Schweinegrippe 2009 konnte im Rahmen dieser Arbeit (Abbildung 6) und in einer Studie deutscher humaner Isolate der Subtypen H3N2, H1N1 und H1N2¹¹⁶ nicht nachgewiesen werden. Interessanterweise hatten 20 Jahre Kozirkulation Amantadin-sensitiver huFLUAV und Amantadin-resistenter swFLUAV keine

Auswirkungen auf die Suszeptibilität der humanen Viren, obwohl Schweine aufgrund $\alpha 2,3$ - und $\alpha 2,6$ -verknüpfte Sialinsäurereste im Respirationstrakt von Viren anderer Spezies gleichzeitig befallen werden können und damit die Möglichkeit zur Reassortierung der Genomsegmente gegeben ist.

Der Ursprung der Amantadinresistenz in den europäischen Schweinepopulationen bleibt weiterhin ungeklärt. Bisher wurden zwei Mechanismen für die Entstehung von resistenten Viren angenommen: i) spontane Substitutionen mit geringer Inzidenz¹¹⁰ und ii) die Selektion resistenter Stämme unter Substanztherapie.¹⁰⁴ Es gibt keine Indikation dafür, dass in Europa jemals Schweine mit Amantadin behandelt wurden. Diese Tatsache spricht dafür, dass das Auftreten der Amantadinresistenz ein natürliches Ereignis darstellt. Auch der Grund für die erstaunliche subtypenübergreifende Ausbreitung der resistenten porcinen Stämme bleibt unerklärlich, wenn auch nicht ungewöhnlich, wie der rapide weltweite Anstieg der Amantadinresistenz bei humanen Viren der Subtypen H1N1 und H3N2 zeigte.^{112, 115, 195} Interessanterweise kann ein übermäßiger Gebrauch des Ionenkanalblockers den steilen Anstieg resistenter huFLUAV in vielen Ländern auch nicht erklären. Einer Studie von Simonson *et al.* zufolge ist die weltweite Ausbreitung der Amantadin-resistenten huH3N2-Viren durch ein 4 + 4 Reassortierungsereignis zwischen zwei verschiedenen H3N2-Linien Anfang 2005 in Hong Kong bedingt.¹¹⁸ Zuvor war die Amantadin-resistente H3N2-Linie über zwei Jahre in Südostasien endemisch.¹¹⁹ Durch die Reassortierung entstanden höchstwahrscheinlich Viren mit höherer Fitness, die sich aufgrund eines neuen HA-Oberflächenproteins weltweit ausbreiten konnten. Die Monophylie der porcinen M-Proteine zeigt, dass die Resistenz in den europäischen Schweinepopulationen einen anderen Entstehungsmechanismus haben muss.¹⁷³

Wegen der hohen Prävalenz Amantadin-resistenter Viren, der schnellen Resistenzentwicklung unter Substanztherapie, der Unwirksamkeit des Wirkstoffs gegen Influenza-B-Viren sowie der häufigen Nebenwirkungen stellen die NA-Hemmer Oseltamivir und Zanamivir momentan die einzig verfügbare Klasse antiviral wirksamer Substanzen gegen die Grippe dar. Der Einsatz dieser beiden NAI wird von der WHO für die Therapie der Vogel- und Schweinegrippe empfohlen.^{197, 198}

Vor dem Ausbruch der A/H1N1v-Pandemie Anfang 2009 war nur wenig über die NAI-Empfindlichkeit der swFLUAV bekannt. Lediglich zu swH3N2-Isolaten gab es publizierte Daten.¹⁹⁹ Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden somit erste Erkenntnisse zur Sensitivität von swFLUAV der Subtypen H1N1 und H1N2 gegenüber den NA-Hemmern Oseltamivir und Zanamivir gewonnen.

Alle untersuchten humanen und porcinen H1N1- und H1N2-Isolate waren im chemilumineszenzbasierten NA-Hemmtest Oseltamivir- und Zanamivir-sensitiv. Die

ermittelten mittleren IC_{50} -Werte (Tabelle 19) stimmen gut mit publizierten Werten für huFLUAV überein^{124, 126, 200} und entsprechen den Resultaten einer weltweiten *Surveillance*-Studie des CDC.¹⁷⁰ Die Ergebnisse bekräftigen die in früheren Arbeiten beschriebene Subtyp-spezifische Empfindlichkeit der viralen NA gegenüber den NAI.^{126, 201, 202} Während die H1N1-Viren gleichsam empfindlich gegenüber beiden Testsubstanzen waren, reagierten die H1N2-Isolate sensitiver gegenüber Oseltamivir als gegenüber Zanamivir. Diese Unterschiede können einer Publikation von Russell *et al.* zufolge auf die 3D-Struktur der viralen NA zurückgeführt werden.¹⁹ Die NA-Subtypen werden in zwei genetisch unterscheidbare Gruppen eingeteilt. Im aktiven Zentrum der N1-Gruppe (N1, N4, N5, N8) wird eine kleine Vertiefung in unmittelbarer Nähe zur Ligandbindungsstelle gebildet (*150 cavity*), welche bei den Subtypen, die der N2-Gruppe (N2, N2, N6, N7, N9) zugeordnet werden, fehlt. Diese Abweichungen führen zu unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der NAI an das aktive Zentrum des Enzyms.

Zusätzlich kann die NAI-Empfindlichkeit auch innerhalb eines NA-Subtyps variieren.²⁰³ Die in der vorliegenden Dissertation analysierten humanen und porzinen H1N2-Viren unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Zanamivirempfindlichkeit und sind bis zu 16fach Zanamivir-unempfindlicher als deutsche humane¹⁷⁷ und porzine H3N2-Isolate.¹⁹⁹ Die in dieser Arbeit generierten phylogenetischen N1- und N2-Stämme (Abbildung 7 und 8) verdeutlichen, dass sich die FLUAV in ihren NA-Oberflächenproteinen unterscheiden und zwei Gruppen (human und porzin) zugeordnet werden können. Im N2-Stammbaum lässt sich die humane Gruppe in weitere drei Subgruppen unterteilen, von denen die huH1N2-Isolate eine eigene Gruppe bilden. Die Unterscheidung in diese Subgruppen erklärt die unterschiedliche Suszeptibilität der huH3N2-FLUAV aus dem Jahr 2006¹⁷⁷ und der huH1N2-Isolate, die nahverwandte zu den H3N2-Stämmen sind, die bis 2004 zirkulierten. In Studien zum phylogenetischen Ursprung des NA-Gens der huH1N2-Viren wurde dieser auf das Isolat A/Moscow/10/99 (H3N2) zurückverfolgt.^{204, 205} Die huH1N2-FLUAV sind in Südostasien zwischen 1999 und 2001 durch Reassortierung huH1N1- mit huH3N2-Stämmen entstanden. Sie wurden über einen Zeitraum von zwei bis drei Jahren in den saisonalen Viren isoliert und anschließend vollständig verdrängt. Die swH1N2-Isolate entstanden 1994 durch Reassortierung von swH3N2-Stämme mit huH1N1-Viren.^{183, 184} Sie breiteten sich von Großbritannien ausgehend in ganz Europa aus und wurden in den europäischen Schweinepopulationen endemisch. Die fortlaufende Evolution der swFLUAV wird durch immer wieder nachgewiesene Reassortitionen verdeutlicht.⁵³

In den NA-Hemmtesten wurde unter den getesteten swH1N1-FLUAV ein milder Ausreißer gegen Oseltamivir und ein milder Ausreißer gegenüber Zanamivir detektiert (Abbildung 4). Bei den huH1N1-Isolaten konnte ebenfalls ein milder Ausreißer gegenüber Oseltamivir

ermittelt werden. Zur Definition von Ausreißern gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. So werden z. B. in einer im Jahr 2006 veröffentlichten Publikation des *Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network* Werte, die um das 1,5 – 3fache des *interquartile range* (IQR) von den 25sten und 75sten Perzentilen entfernt liegen als milde Ausreißer und Werte, die darüber liegen ($> 3 \times \text{IQR}$) als extreme Ausreißer bezeichnet.¹²⁶ Nach den in der vorliegenden Dissertation angewandten strengeren Kriterien einer 4570 Isolate umfassenden große Studie des CDC aus dem Jahr 2008¹⁷⁰ werden Viren als potentiell resistent bezeichnet, wenn ihr IC_{50} -Wert mehr als drei Standardabweichungen vom Mittelwert aller untersuchten Isolate entfernt liegt ($\text{IC}_{50} > \text{Mittelwert} + 3 \text{ Standardabweichungen}$; milder Ausreißer). IC_{50} -Werte über dem 10fachen des Mittelwerts aller untersuchten Isolate definieren extreme Ausreißer ($\text{IC}_{50} > 10 \times \text{Mittelwert}$) und werden aus den statistischen Analysen ausgeschlossen.

Die im Rahmen dieser Arbeit detektierten milden Ausreißer sind Viren mit Drift-Mutationen im NA. Untersuchungen der NA-Sequenzen ergaben keine der in der Literatur beschriebenen Resistenz-vermittelnden Substitutionen.¹³⁹ Bei dem huH1N1-Stamm A/Berlin/60/05 konnten im Vergleich zu den anderen huH1N1-Viren die Substitutionen L134M und I266V nachgewiesen werden (GenBank: ACI32765). Die Position L134 gehört zum einen zur Sialinsäurebindestelle und zum anderen ist sie Bestandteil der *150 cavity* der N1-Viren.^{19, 206, 207} I266 ist in der Nähe von AS des aktiven Zentrums lokalisiert, für welche Stabilisationseigenschaften bei der Oseltamivirbindung an das aktive Zentrum von A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) beschrieben wurden.²⁰⁷ Da bisher keine experimentellen Daten zu Veränderungen an diesen Positionen vorliegen, kann nur spekuliert werden, dass eine der oben genannten AS-Substitutionen einen Einfluss auf die Topologie mindestens einer der beiden Spalten hat und somit auch die Substanzbindung beeinträchtigt. Die Substitution I266V wurde auch in einer globalen *Surveillance*-Studie des *Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network* beschrieben.¹²⁶ Diese Studie und Untersuchungen einer französischen Arbeitsgruppe²⁰⁰ belegen, dass die reduzierte NAI-Empfindlichkeit einiger humaner Isolate auf Drift-Mutationen in der NA außerhalb des aktiven Zentrums begründet sein kann. Ähnliche Schlussfolgerungen wurden ferner für H5N1-Viren mit reduzierter Sensitivität gegenüber Oseltamivir gezogen.^{136, 137} Die klinische Relevanz der I266V-Substitution bei A/Berlin/60/05 (H1N1) für die Therapie mit Oseltamivir bleibt weiterhin offen. Wegen der geringen Pathogenität der huFLUAV in der Maus (siehe Punkt 6.3.1) ließen sich mit diesen Isolaten keine antiviralen Versuche *in vivo* durchführen. Das anhand von Literaturangaben^{192, 193, 208, 209} und den Erfahrungen mit dem mausadaptierten Stamm A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) sowie swFLUAV²¹⁰ gewählte experimentelle Design für antivirale Untersuchungen in BALB/c-Mäusen war für diese Stämme nicht anwendbar.

Diese Entwicklung verdeutlicht, dass für die Beurteilung der NA-Empfindlichkeit zirkulierender FLUAV die in den letzten Jahren verstärkt angewandte Pyrosequenzierung^{211, 212} und Analyse der für die Resistenzentwicklung beschriebenen NA-Positionen keinesfalls ausreichend sind. Vielmehr können durch die Sensitivitätsbestimmung mit fluoreszenz- oder chemilumineszenzbasierten NA-Hemmtesten in Kombination mit der Sequenzierung des gesamten NA-Oberflächenproteins auch neu entstandene Drift-Mutationen detektiert und analysiert werden.

Während bis zur Saison 2006/07 generell nur wenige huH1N1-Isolate bedingt durch eine H274Y-Mutation im NA-Glykoprotein Oseltamivir-resistent waren und diese veränderten Viren aufgrund ihrer geringen Virulenz keine großen klinischen Konsequenzen hatten, waren einer Studie des CDC zufolge in der darauf folgenden Saison bereits ~ 99 % der huH1N1-Stämme unempfindlich.¹⁹⁶ Bei diesen Isolaten blieben trotz der Substitution die Virulenz und Replikationseigenschaften vollständig erhalten und sie konnten sich weltweit ausbreiten. Da die Mutation auch in Ländern mit seltenem Oseltamivireinsatz auftrat, kann davon ausgegangen werden, dass die Resistenz ohne Selektionsdruck auf natürliche, sponante Weise entstanden ist.¹³⁵ Diese Oseltamivir-resistenten huH1N1-Viren wurden in der Saison 2009/10 fast vollständig durch die neu aufgetretenen pandemischen H1N1-Viren ersetzt, deren NA als Oseltamivir-sensitiv charakterisiert wurde.^{213, 214} Aber auch unter den pandemischen Stämmen kam es zum Auftreten der Resistenzmutation H274Y (N2-Nummerierung, entspricht H275Y in N1), vor allen bei Immunsupprimierten und Patienten mit fehlgeschlagener Chemotherapie.⁸⁴ Ferner konnten diese resistenten Viren bei unbehandelten Patienten nachgewiesen werden, was zeigt, dass Sekundärübertragungen möglich waren.²¹⁵ Bis November 2009 wurden von der CDC 0,5 % der pandemischen H1N1-Stämme als Oseltamivir-resistent charakterisiert. Auch von den im Zeitraum von April 2009 bis April 2010 in Deutschland isolierten A/H1N1v-Stämmen waren 0,5% bedingt durch die H274Y-Mutation resistent gegenüber dem NA.²¹⁶ In den meisten Fällen ist trotz Oseltamivirresistenz eine Therapie mit Zanamivir möglich. Allgemein sind Zanamivirresistenzen selten, wurden aber in wenigen Fällen nach Behandlung immunkomprimierter Patienten nachgewiesen.^{127, 138} In einer Studie australischer und südostasiatischer huH1N1-FLUAV von 2006 bis Anfang 2008 wurde in ~ 2,3 % der Viren die NA-Substitution Q136K ermittelt, die eine Zanamivirresistenz dieser Isolate bedingt.²¹⁷ Die Viren waren weder in ihrer Fitness noch in ihrer Infektions- und Transmissionsfähigkeit im Frettchenmodell beeinträchtigt.

Neben den Untersuchungen zur direkten Hemmung der viralen NA durch Oseltamivir und Zanamivir im Enzymhemmtest wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation auch

zellkulturbasierte Testsysteme angewandt. Bei fast allen untersuchten humanen und porzinen H1N1- und H1N2-Isolaten korrelierte der Schutz in MDCK-Zellen (Tabellen 21 – 24, Abbildung 5) mit den im NA-Hemmtest ermittelten Daten. Unterschiede wurden bei den porzinen Isolaten A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ sowie A/swine/Bakum/1832/00 und A/swine/Bakum/1833/00 (beide H1N2) ermittelt. Diese drei Viren waren in allen drei zellkulturbasierten Untersuchungen NAI-resistent, obwohl sie im Enzymhemmtest sensitiv gegenüber den Testsubstanzen reagierten. Weder beeinflussten die NAI die Plaqueanzahl und -größe dieser Isolate, noch wurden die Viruserträge inhibiert oder die Ausbreitung der Virusinfektion in MDCK-Zellen unterbunden. Es wird angenommen, dass solche Testsystem-spezifischen Unterschiede in der NAI-Empfindlichkeit von FLUAV durch eine gestörte Balance der viralen NA- und HA-Funktionen verursacht werden.²¹⁸ Die HA-Rezeptorbindungsaffinität kann durch verschiedenste Faktoren, wie z. B. das zelluläre Rezeptorexpressionsmuster, Substitutionen in der Rezeptorbindungsstelle des Proteins oder der Anzahl und Lokalisation von Glykosylierungsstellen, beeinträchtigt werden. Eine reduzierte virale Bindung an die entsprechenden Rezeptoren führt dazu, dass neu gebildete Virionen die infizierten Zellen auch ohne funktionstüchtige NA verlassen können. In diesem Fall ist eine Behandlung mit den NA-Hemmern uneffektiv.

In der Literatur wurde darauf hingewiesen, dass die Verwendung von MDCK-Zellen für die antivirale Testung der NAI gegen huFLUAV wegen der niedrigen α 2,6-Expression zu falschen Ergebnissen führen kann.^{164, 182} Die Verteilung α 2,3- und α 2,6-verknüpfter Sialinsäurereste auf den für alle *In vitro*-Untersuchungen der vorliegenden Dissertation verwendeten MDCK-Zellen sowie auf MDCK-SIAT1-, MDBK- und NHBE-Zellen wurden mithilfe von FACS-Analysen sowie immunhistochemisch nachgewiesen (Tabelle 20). Beide Rezeptortypen wurden im gleichen Verhältnis auf den MDCK-Zellen nachgewiesen und damit die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse bestätigt.²¹⁹⁻²²¹ Im Gegensatz dazu konnte die Überexpression α 2,6-verknüpfter Sialinsäurereste auf MDCK-SIAT1-Zellen^{164, 182} jedoch nicht bestätigt werden. Mit der Entwicklung von Zellen, die durch Transfektion mit SIAT1 α 2,6-verknüpfte Sialinsäurereste überexprimieren (z. B. MDCK-SIAT1-Zellen) sollte ein Zellsystem entwickelt werden in dem huFLUAV effektiv binden und die natürliche Infektion dieser Viren *in vitro* nachempfunden werden kann.^{164, 182} Möglicherweise ist die Transfektion mit dem SIAT1-Vektor jedoch nicht stabil.

Die Verwendung von NHBE-Zellen wird als ideales System zum Studium der Replikation, Transmission und Pathologie von huFLUAV angesehen.⁴¹ Die Zellen gleichen dem humanen Atemwegsepithelium morphologisch und funktionell.^{153, 222} Sie imitieren die Rezeptorverteilung des oberen Respirationstrakts und gelten somit als besonders geeignet für diese Untersuchungen, weil die natürlichen Gegebenheiten des Wirts *ex vivo*

nachempfunden werden können.^{41, 223} Auch für Studien zur antiviralen Empfindlichkeit humaner und aviärer FLUAV verbunden mit der Identifizierung resistenter H5N1-Isolate wurden sie in der Literatur empfohlen.¹⁵⁷ Anders als in dieser Studie postuliert, konnte sowohl in der vorliegenden Dissertation als auch in FACS-Analysen einer anderen Arbeitsgruppe²²⁴ gezeigt werden, dass sich das Rezeptorexpressionslevel der NHBE-Zellen ähnlich zu dem von MDCK-Zellen verhält. Untersucht wurden sowohl undifferenzierte Zellen als auch im *Air Liquid Interface* über einen Zeitraum von vier Wochen ausdifferenzierte Zellen, die ähnlich hohe Anteile beider Rezeptoren bildeten. Histochemische Untersuchungen von Matrosovich *et al.* und Thompson *et al.* wiesen die Expression α 2,3-verknüpfter Sialinsäurereste auf Zilienzellen und α 2,6-verknüpfter Sialinsäuren auf zilienlosen Zellen nach.^{41, 223} Auf einigen Zilienzellen wurden auch Sialinsäurereste in α 2,6-Verknüpfung nachgewiesen, ein Indiz für humane und aviäre Rezeptoren auf diesen Zellen, wodurch auch die Möglichkeit zur Reassortion während der humanen Infektion mit FLUAV unterschiedlicher Ursprünge gegeben ist.²²³

Bedeutende Nachteile der primären Atemwegsepithelzellen für den breitflächigen, standardisierten Einsatz bei der Testung der Suszeptibilität gegenüber den NA-Hemmern sind i) die hohen Kosten für die Anzucht und das Wachstum im *Air Liquid Interface*, ii) der hohe zeitliche Arbeitsaufwand (täglicher Medienwechsel, intensives Spülen zur Entfernung des mukösen Schleims) und iii) keine Sicherheit, dass die Zellen sich ausdifferenzieren. So konnten in dieser Arbeit z. B. nach Wachstum im *Air Liquid Interface* keine Zilien nachgewiesen werden, obwohl diese laut Literaturangaben nach ~ 21 Tagen gebildet werden sollen.¹⁵³ Der Hersteller gibt keine Garantie auf Redifferenzierung dieser Zellen, wodurch kann eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen nicht garantiert werden kann. Ein weiterer Nachteil dieser Zellen liegt iv) in der niedrigtitrigen Replikation der getesteten Viren dieser Arbeit und anderer Studien¹⁵⁷ begründet, wodurch die Beurteilung einer möglichen NAI-Wirkung erschwert wird.

Wegen dieser Schwierigkeiten und aufgrund der Tatsache, dass sich auch die MDCK-SIAT1- und NHBE-Zellen im α 2,3-/ α 2,6-Expressionsmuster nicht wesentlich von den MDCK-Zellen unterscheiden, konnte davon ausgegangen werden, dass die im Labor routinemäßig für die Testung der antiviralen Wirksamkeit verschiedener Substanzen gegen FLUAV verwendeten MDCK-Zellen geeignet sind. Ein großer Vorteil dieser Zellen besteht darin, dass sich aufgrund der Expression beider Rezeptortypen sowohl aviäre als auch humane FLUAV in ihnen replizieren. Auch können bei Verwendung des gleichen Zelltyps die Ergebnisse der antiviralen Testung verschiedener FLUAV (human, aviär, porzin) direkt miteinander verglichen werden. Ferner sind diese Zellen besonders für die Testung der swFLUAV geeignet, weil bei den zirkulierenden Subtypen sowohl *avian*- (swH1N1-FLUAV) als auch *human-like* (swH1N2-FLUAV) HA-Oberflächenproteine

exprimiert werden.¹⁸³⁻¹⁸⁵ Zudem ermöglichen die AS Gln226, Gly228, Asp190 (H1N1 und H1N2) sowie Gly225 (H1N1) und Asp225 (H1N2) in und nahe der HA-Rezeptorbindungsstelle (Tabelle 26) die Bindung beider porciner Subtypen an Rezeptoren mit α 2,3- und α 2,6-verknüpften Sialinsäureresten,^{29, 225, 226} was mit früheren Studien zur Rezeptorbindungspräferenz der swFLUAV^{225, 227-229} und mit dem Vorhandensein beider Rezeptortypen im oberen Respirationstrakt ihres Wirtes übereinstimmt (Abbildung 10).⁴⁴

Neben spezifischen AS-Substitutionen im aktiven Zentrum der NA oder in dessen unmittelbarer Nähe, die die NAI-Empfindlichkeit der FLUAV deutlich reduzieren oder komplett aufheben,¹³⁹ können Mutationen im HA-Oberflächenprotein die Effizienz der Virusbindung an Sialinsäuren und damit die virale Abhängigkeit von einer funktionellen NA beeinflussen und die Wirkung der NAI in der Zellkultur reduzieren.^{125, 139, 144, 145}

Die für die *In vitro*-Untersuchungen in MDCK-Zellen ausgewählten swH1N2-Isolate A/swine/Bakum/1832/00 und A/swine/Bakum/1833/00 exprimierten potentielle N-Glykosylierungsstellen an den AS-Positionen Asn158, Asn163 und Asn271, die bei den swH1N1-FLUAV nicht nachgewiesen werden konnten (Tabelle 25). Diese potentiellen Glykosylierungsstellen blieben auch nach weiteren MDCK- und nach den Mauspassagen unverändert. Auch bei den in dieser Arbeit untersuchten huH1-FLUAV konnte das N – X – S/T-Erkennungssignal für N-Glykane an der Position Asn163, jedoch nicht an Asn158 und Asn271 nachgewiesen werden. Vergleichende Analysen mit den in der GenBank enthaltenen HA-Sequenzen europäischer FLUAV des Subtyps H1 ergaben für alle swH1N2- sowie für huH1N1-Isolate eine potentielle Glykosylierungsstelle an AS-Positionen Asn163 (Abbildung 9).

Die beiden swH1N2-Isolate sowie fünf von sechs huH1N2- und 16 von 28 huH1N1-FLUAV vermochten Hühnererythrozyten bei 4 °C nur schlecht und bei 37 °C nicht zu hämagglutinieren (Tabellen 4 – 6). Die aufgrund der Glykosylierungen geschwächte Bindung des HA an die Rezeptoren auf der Erythrozytenoberfläche ist bei 37 °C reversibel. Des Weiteren konnten sechs der huH1N1-Isolate die Erythrozyten bei beiden Temperaturen nicht agglutinieren. Diese Ergebnisse bestätigen, dass Glykanseitenketten nahe der Rezeptorbindungsstelle die Rezeptorbindungseigenschaften der FLUAV beeinflussen können.^{16, 230, 231} Einer Studie von Mishin *et al.* zufolge reduzieren vor allem Glykane an den Positionen Asn129 und Asn163 die Agglutination von Hühnererythrozyten, wobei Asn163 die dominierende Rolle spielt.¹⁴⁵ An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass die Vernetzung der roten Blutkörperchen durch FLUAV ebenfalls aufgrund von Substitutionen in oder in der Nähe der Rezeptorbindungsstelle verhindert werden kann. So kann die Abnahme der viralen Hämagglutinationsfähigkeit auch auf der G225D-Substitution dieser Viren beruhen. Die

genotypische Analyse des HA zeigte, dass bis auf zwei Isolate alle huH1-FLUAV und die beiden swH1N2-Stämme D225 exprimieren. Morishita *et al.* konnten nachweisen, dass das Aspartat in dieser Position bei huH1N1-FLUAV die Agglutination von Hühnererythrozyten deutlich reduziert.²³²

Ein Großteil der in der vorliegenden Arbeit untersuchten swH1N2-FLUAV zeigte trotz der vorhandenen potentiellen Glykanseitenketten an der HA-AS-Position Asn163 eine hohe Affinität gegenüber den Hühnererythrozyten und konnte diese irreversibel agglutinieren (Tabelle 4). Da diese Isolate ursprünglich auf MDBK-Zellen (nur $\alpha 2,3$ -Rezeptoren) vermehrt wurden, ist es durchaus möglich, dass sie eine erhöhte Präferenz für NeuAc $\alpha 2,3$ Gal-Rezeptoren besitzen und damit auch sehr gut an die aviären Erythrozyten binden können. Zudem wurde eine tatsächliche Glykosylierung der Isolate im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht überprüft, wodurch an dieser Stelle nur Vermutungen hinsichtlich der Ursachen für die differenten Eigenschaften geäußert werden können.

Wie bereits erläutert waren A/swine/Bakum/1832/00 und A/swine/Bakum/1833/00 (beide H1N2) mit den zusätzlichen drei potentiellen N-Glykosylierungsstellen an den Positionen Asn158, Asn163 und Asn271 in den zellkulturbasierten Plaquereduktions- und Virusertragshemmtesten in MDCK-Zellen um mehr als das 10fache NAI-unempfindlicher als die nicht glykosylierten sensitiven swH1N1-FLUAV (Tabellen 21 und 22). Mishin *et al.* konnten mithilfe Reverser Genetik nachweisen, dass Glykane an der AS-Position Asn163 drastische Reduktionen in der Empfindlichkeit gegenüber Oseltamivir und Zanamivir verursachen.¹⁴⁵ Zudem gab es in dieser Studie Hinweise darauf, dass diese Seitenketten für die Freisetzung neu gebildeter Viren ohne funktionstüchtige NA entscheidend sind. Aufgrund der stärkeren HA-Glykosylierung interagieren diese FLUAV schwächer mit dem Rezeptor und benötigen zur Virusfreisetzung eine geringere NA-Aktivität, woraus zudem eine verminderte NAI-Empfindlichkeit resultiert.

Die Daten aus den zellkulturbasierten Untersuchungen mit ausgewählten huFLUAV können diese Ergebnisse von Mishin *et al.* allerdings nicht bestätigen. Obwohl alle huFLUAV potentielle Glykosylierungsstellen an der HA-AS-Position Asn163 exprimierten (Tabelle 25), konnte bei ihnen keine Veränderung in der NAI-Empfindlichkeit in den Virusertragshemmtesten in MDCK-Zellen im Vergleich zu A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) ohne diese möglichen Glykanseitenketten beobachtet werden (Tabelle 24).

Aufgrund der differenten *In vitro*-Ergebnisse zur NAI-Empfindlichkeit der humanen und swFLUAV kann an dieser Stelle nur vermutet werden, dass die reduzierte Sensitivität der beiden swH1N2-Isolate auf der Expression der zusätzlichen potentiellen N-Glykosylierungsstellen in den Positionen Asn158, Asn163 und Asn271 in Kombination resultiert.

7.2 Etablierung eines Mausmodells für Untersuchungen zur Empfindlichkeit humaner und porciner Influenza-A-Viren *in vivo*

Für die Entwicklung neuer Therapeutika und die Überprüfung der Virustatikaempfindlichkeiten von FLUAV bedarf es eines geeigneten Tiermodells, in welchem die Hauptaspekte des humanen Krankheitsbildes reproduziert werden können. Ein Review von Bernard gibt einen Überblick über die verschiedenen Tiermodelle für Untersuchungen zur Pathogenität und Therapie der Influenza.¹⁹⁰

Generell sind Mäuse, insbesondere BALB/c-Mäuse und Frettchen die gebräuchlichsten Modellsysteme für die Influenza. Studien mit antiviralen Substanzen zeigten, dass aus der Empfindlichkeit in der Maus Schlussfolgerungen auf die Wirkung im Menschen gezogen werden können. So wurden alle derzeit verfügbaren Virustatika zunächst in Mäusen getestet. Obwohl in diesen Tieren nicht alle klinischen Symptome des Menschen wie Schnupfen, Fieber, Niesen oder Husten beobachtet werden können, sind eine Vielzahl von Parametern Marker für die Schwere der FLUAV-Infektion. Ein bedeutender Vorteil dieses Modellsystems im Vergleich zu anderen Tiermodellen ist zweifellos die kostengünstige Möglichkeit zur Testung antiviraler Substanzen und Vakzine.

Aber die Pathogenese porciner und humaner FLUAV in der Maus kann nicht mit einer Infektion unter natürlichen Gegebenheiten verglichen werden. Frettchen werden immer häufiger genutzt um Ergebnisse aus den Mausstudien zu ergänzen oder zu verifizieren. Das Frettchen ist das idealste Modell um den natürlichen Infektionsweg und die Krankheitssymptome nach der Infektion mit huFLUAV *in vivo* zu imitieren.^{190, 233}

Für die porcinen Isolate stellt der natürliche Wirt das beste Versuchstier dar. Zudem sind Schweine empfindlich für Infektionen aviärer, porciner und auch humaner FLUAV.⁴³ Besonders für Vakzinierungsexperimente mit Schweineimpfstoffen wurde dieses Modellsystem in den letzten Jahren vielfältig eingesetzt und erwies sich als sehr geeignet zur Nachahmung der natürlichen Infektion mit swFLUAV.²³⁴⁻²³⁶

Für die Untersuchungen zur Oseltamivirtherapie ausgewählter humaner und porciner FLUAV-Infektionen im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde das Mausmodellsystem gewählt. Zusätzlich konnte für ein porcines Isolat die Oseltamivirempfindlichkeit mit dem Therapieerfolg im natürlichen Wirt verglichen werden.

Obwohl BALB/c-Mäuse bereits seit vielen Jahren routinemäßig für Untersuchungen der Influenzainfektion zum Einsatz kommen, war bis 2009 nichts über die Verteilung der $\alpha 2,3$ - und $\alpha 2,6$ -verknüpfen Sialinsäurerezeptoren im murinen Atemwegstrakt bekannt. Mittels immunhistochemischer Färbungen auf formalinfixierten Gewebeproben konnten beide Rezeptoren auf den Atemwegsepithelien nachgewiesen werden (Abbildung 10).

Allerdings exprimieren sowohl die Lungen als auch die Tracheen die NeuAcα2,3Gal-Reste in deutlichem Überschuss. Die Ergebnisse stimmen mit unlängst publizierten Daten einer chinesischen Arbeitsgruppe²³⁷ überein.

Bei den Untersuchungen zur Pathogenität ausgewählter humaner und porciner FLUAV wurden auffällige Unterschiede zwischen den Isolaten beobachtet. Die beiden huH1N1-FLUAV A/New Caledonia/20/99 und A/Berlin/60/05 induzierten in den infizierten Mäusen keine klinisch manifestierte Erkrankung (siehe Punkt 6.3.1). Die Tiere verloren kein oder nur geringfügig an Körpergewicht und entwickelten mit Ausnahme von struppigem Nackenhaar keine weiteren Krankheitssymptome, obwohl infektiöses Virus in den Lungen und Tracheen nachweisbar war. Diese Ergebnisse korrelieren sehr gut mit Literaturdaten zur geringen Pathogenität saisonaler huFLUAV in Mäusen,^{238, 239} da die Tiere schwerempfindlich gegenüber diesen FLUAV sind.¹⁹⁰ In Hinblick auf antivirale *In vivo*-Untersuchungen mit den in dieser Arbeit ausgewählten huFLUAV könnte ihre Virulenz durch mehrfache Lungenpassagen im murinen Wirt gesteigert werden. In einer Studie von Smee *et al.* aus dem Jahr 2006 waren für das huH1N1-FLUAV A/New Caledonia/20/99 sieben und den Influenza-B-Stamm B/Sichuan/379799 zehn solche Passagen notwendig.²⁴⁰ Diese Passagen führen u. a. zu Modifikationen in der Antigenität des HA-Glykoproteins²⁴¹ und sind nicht immer von Erfolg gekrönt. Durch die intranasale Verabreichung von 0,5 mg Mannan (Polysaccharid der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*) während der Virusinokulation könnten diese aufwendigen Passagierungsversuche umgangen werden.²⁴² Die Inhibierung von wirtseigenen Abwehrkollektinen steigert die Virusreplikation in den Mäusen um den Faktor 100, wodurch auch mit nichtadaptierten Virusisolaten antivirale Studien durchführbar wären.

Im Gegensatz zu den huFLUAV waren die Infektionen mit den swFLUAV für die Mäuse virulent. Die A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-Isolate „Berlin“ und „Dessau“ mit *avian-like* HA-Oberflächenprotein waren hochpathogen und induzierten nach der Infektion mit 10^5 TCID₅₀/20 µl deutliche Krankheitssymptome, gekennzeichnet von starker Apathie der erkrankten Tiere. Sie bekamen sehr struppiges Fell und veränderten ihre Körperhaltung. Das Körpergewicht sank um ~ 20 % und in den Lungen und Tracheen konnte eine hohe Viruslast nachgewiesen werden (siehe Punkt 6.3.1). Die gewählte Infektionsdosis war in 10 – 30 % der Fälle für die Tiere am Tag 7 p. i. letal. Diese Daten stimmen mit Ergebnissen zur Infektion weiblicher BALB/c-Mäuse mit A/swine/Potsdam/15/81 (H1N1) überein.²¹⁰

Die Inokulation von A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2) in einer Dosis von 10^6 TCID₅₀/20 µl verlief hingegen weniger pathogen. Sie resultierte in einem Körpergewichtsverlust von ~

12 % im Vergleich zum Ausgangsgewicht der infizierten Tiere und hohen Viruslasten in den Organen des Respirationstrakts. Auch die klinische Symptomatik der swH1N2-Infektion war im Vergleich zur Pathogenität der swH1N1-FLUAV trotz einer um den Faktor 10 höheren Infektionsdosis deutlich schwächer ausgebildet. Die erkrankten Tiere entwickelten lediglich ein struppiges Fell. Sie waren in ihren Bewegungsabläufen nicht beeinträchtigt und verstarben nicht an der Virusinfektion.

Die im Rahmen der vorliegenden Dissertation durchgeführten Untersuchungen zur Pathogenität der swFLUAV in der Maus stellten ein Novum dar, denn für endemische europäische swFLUAV gibt es keine publizierten *in vivo*-Daten in diesem Tiermodellsystem. Eine Studie von Belser *et al.* vergleicht die Virulenz verschiedener Patienten isolate des im letzten Jahr aufgetretenen A/H1N1v-Pandemiestammes mit dem rekonstruierten Virus von 1918, einem swH1N1-FLUAV aus dem Jahr 1976, der US-amerikanischen porzinen Triple-Reassortante und HPAIV vom Subtyp H5N1.²⁴³ Direkte Vergleiche zu den europäischen swH1N1-FLUAV mit einem *avian-like* HA-Oberflächenprotein können leider nicht gezogen werden, da alle H1N1-Isolate der zitierten Studie der *classical swine*-Linie angehörten. Dennoch zeigte diese Arbeit deutliche Unterschiede zwischen weniger virulenten und hochpathogenen Stämmen in BALB/c-Mäusen auf. Obwohl sich die Viren beider Gruppen effizient in den Lungen replizierten, induzierten die letalen und virulenten 1918- und H5N1-Viren einem Körpergewichtsverlust der erkrankten Tiere von mehr als 20 % ihres Ausgangsgewichtes. Die Morbidität der niedrigpathogenen, nichtletalen Isolate viel mit einer Gewichtsabnahme von weniger als 10 % des Ausgangsgewichts hingegen sehr mild aus. Diese Werte korrelieren gut mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit generierten Daten zu den virulenten swH1N1-FLUAV und dem niedrigpathogenen swH1N2-Isolat.

Zusätzlich zu den virusbedingten Veränderungen im Körpergewicht und Allgemeinbefinden der infizierten Tiere unterschieden sich die swFLUAV hinsichtlich der induzierten histologischen Veränderungen in den Lungen (Abbildungen 15 und 18). Die beobachteten Unterschiede stimmen ebenfalls gut mit den publizierten Daten von Belser *et al.* überein.²⁴³ Der weniger virulente A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2)-Stamm induzierte eine milde bis moderate Bronchiolitis und Alveolitis, wohingegen die Infektionen mit den hochpathogenen swH1N1-FLUAV einhergingen mit moderaten bis schweren Inflammationen, Nekrosen im bronchialen und alveolären Epithelium sowie alveolären und hilären interstitiellen Ödemen.

Die Unterschiede in der Pathogenität der hier untersuchten FLUAV in der Maus können zum einen auf einer ineffizienten Bindung der Viren mit *human-like* HA-Oberflächenproteinen (huH1N1-FLUAV A/New Caledonia/20/99, A/Berlin/60/05 sowie das

swH1N2-Isolat A/swine/Bakum/1832/00) an die Atemwegsepithelien der Maus resultieren. Wie zuvor erläutert, werden sowohl im oberen als auch im unteren Respirationstrakt dieser Tiere α 2,3-verknüpfte Sialinsäurereste im Überschuss exprimiert. Möglicherweise können die swH1N1-FLUAV mit *avian-like* HA bevorzugt an diese Rezeptoren binden und sich effizienter vermehren.

Des Weiteren wird angenommen, dass N-Glykosylierungen die virale Replikationseigenschaft und Pathogenität *in vivo* reduzieren.^{16, 244} Die geringere Pathogenität des swH1N2-Stammes A/swine/Bakum/1832/00 (sieben potentielle HA-Glykosylierungsstellen) sowie der huH1N1-Isolate A/New Caledonia/20/99 und A/Berlin/60/05 (beide acht potentielle HA-Glykosylierungsstellen) im Vergleich zu A/Puerto Rico/8/34 und A/swine/Belzig/2/01 (beide H1N1, vier bzw. fünf potentielle HA-Glykosylierungsstellen) bekräftigen diese Vermutungen. Auch das deutsche swH1N1-FLUAV A/swine/Potsdam/15/81 mit fünf potentiellen Glykosylierungsstellen im HA-Oberflächenprotein erwies sich als stark pathogen in BALB/c-Mäusen.²¹⁰

7.3 Oseltamivirempfindlichkeit von A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2) in der Maus und im Schwein

Die Analyse der AS des HA-Oberflächenproteins ergab für swH1N2-FLUAV potentielle N-Glykosylierungsstellen an den Positionen Asn158, Asn163 und Asn271, während bei den swH1N1-Isolaten das Erkennungssignal für Glykane an diesen Stellen nicht nachgewiesen werden konnte (Tabelle 25). Da die beiden swH1N2-Stämme A/swine/Bakum/1832/00 und A/swine/Bakum/1833/00 in den zellkulturbasierten Untersuchungen in MDCK-Zellen unempfindlich gegenüber den NA-Hemmern waren, sollte die Relevanz dieser HA-Veränderungen auf die Effizienz der Oseltamivirtherapie am Beispiel von A/swine/Bakum-1832/00 (H1N2) *in vivo* untersucht werden. Wie zuvor erläutert, erwies sich dieses Isolat als gering pathogen für weibliche BALB/c-Mäuse. Entsprechend einer Publikation von Sidwell und Smee können aber auch mit nichtletalen FLUAV antivirale Untersuchungen in der Maus durchgeführt werden.²⁴¹

Die Kooperation mit Dr. Dürrwald (IDT Biologika GmbH Dessau-Roßlau) im Rahmen des BMBF-geförderten *FluResearchNet* ermöglichte zudem die Testung der antiviralen Wirksamkeit von Oseltamivir in seiner Handelsform Tamiflu® gegen dieses swH1N2-Isolat im natürlichen Wirt.

Die speziesspezifischen Unterschiede in der Esteraseaktivität bedurften dem Einsatz unterschiedlicher Substanzdosen.¹³⁰ Oseltamivir in einer Konzentration von 10 mg/kg/Tag bei der Maus entspricht der für die klinische Therapie Influenza-infizierter Patienten

empfohlenen Substanzmenge. Bisher sind keine Studien zur antiviralen Influenzatherapie im Schwein publiziert, weswegen von Dr. Dürrwald die verabreichte Dosis von 150 mg/Tag in Anlehnung an die humane Behandlungsdosis gewählt wurde.

In Anlehnung an die Literatur^{191-193, 208, 245} wurden die Parameter i) Überlebensrate, ii) Körpergewichtsverlauf und iii) virale Replikation in der Lunge zur Beurteilung der antiviralen Wirksamkeit des NA-Hemmers im Mausmodell herangezogen. Die zusätzlich erhobenen Daten iv) Zeitpunkt der Genesung, v) Unterschiede im Lungengewicht und vi) der Lungenpathologie, vii) Virustiter in den Tracheen sowie viii) HI-AK-Titer ermöglichten weitere Vergleiche zwischen den Substanz- und placebobehandelten Gruppen.

In der Maus reduzierte die Oseltamivirbehandlung die Schwere und Dauer der Krankheitssymptome signifikant (siehe Punkt 6.3.3). Die Mäuse erholten sich ~ 2,4 Tage schneller von der Erkrankung als placebobehandelte Tiere. Doch die Therapie hatte keine Auswirkungen auf die Körpergewichtsverluste der Tiere, die Virustiter in den Lungen und Tracheen am Tag 4 p. i. sowie die Schwere der Lungenschädigungen. In einer Studie von Sidwell und Smee hingegen waren in substanzbehandelten, A/NWS/33 (H1N1)-infizierten Tieren die Untersuchungsparameter Lungengewicht, -schädigung und Viruslast in diesem Organ signifikant besser als in infizierten, unbehandelten Tieren.²⁴¹ Allgemein scheint die Wirkungseffizienz der NA-Hemmer vom untersuchten Virusstamm anzuhängen, wie Untersuchungen neuerer humaner Viren wie A/Bayern/57/93 (H1N1)²⁰⁹ oder dem H1N1-Impfstamm A/New Caledonia/20/99 und dem Influenza-B-Virus B/Sichuan/379/99²⁴⁰ zeigten. Ähnlich zu den Ergebnissen der Infektion von Mäusen mit dem swH1N2-Stamm konnten auch in diesen Studien keine signifikanten Unterschiede in den zuvor genannten Parametern zwischen den substanz- und placebobehandelten Gruppen ermittelt werden. Hingegen bewirkte die antivirale Behandlung A/Japan/305/57 (H2N2)-²⁴⁶ und A/Vietnam/1203/04 (H5N1)-^{193, 208} infizierter Tiere signifikante Titerreduktionen in der Lunge. Zur Ausprägung von Lungenschäden wurden in diesen Arbeiten keine Aussagen getroffen. Erschwerend kommt bei dem Vergleich eigener Daten mit den Literaturangaben und der Beurteilung der Substanzwirkung hinzu, dass es keine einheitlich festgelegten Zeitpunkte zur Erhebung der einzelnen Parameter gibt.

Die *In vivo*-Ergebnisse aus dem antiviralen Versuch mit A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2) indizieren, dass Oseltamivir in der Maus nicht zur vollständigen Reduktion der Virusausbreitung führt, obwohl die virale NA im Enzymhemmtest hochempfindlich gegenüber der Substanz reagierte.

Die Infektion von Schweinen mit dem swH1N2-Isolat führte in den unbehandelten Tieren zur Erkrankung, die ähnlich zu in der Literatur beschriebenen Infektionen mit Viren der Subtypen H1N1, H1N2 und H3N2 verlief.^{234-236, 247, 248} Die Tiere bekamen einen Tag nach

der Infektion hohes Fieber ($> 41\text{ }^{\circ}\text{C}$) und entwickelten respiratorische Symptome, die über einen Zeitraum von vier Tagen p. i. andauerten (siehe Punkt 6.3.4).

Die antivirale Testung im natürlichen Wirt stellte ein Novum dar. Zur besseren Einschätzung der Oseltamivirtherapie in den Tieren wurde deshalb parallel eine Gruppe von zehn Schweinen zweifach in einem Intervall von 21 Tagen (Beginn vier Wochen vor der Virusinokulation) mit dem von der IDT Biologika GmbH entwickelten Schweineimpfstoff RESPIPORC FLU3 immunisiert und zusammen mit den Tieren der anderen Gruppen infiziert.

Wie die Vakzinierung schützte auch die Tamiflu®-Behandlung vor der fiebrigen Erkrankung und der Ausbildung klinischer Symptome. Weiterhin konnte die Virusausscheidung signifikant reduziert werden (Abbildung 19C), auch wenn sich trotz Therapie die Viren im unteren Respirationstrakt vermehrten (Tabelle 34) und Lungenschäden verursachten (Abbildung 20).

Im Ergebnis dieser Untersuchungen im porzinen Wirt kann davon ausgegangen werden, dass durch eine Oseltamivirbehandlung die Klinik der Influenza und die Ausbreitung von swFLUAV eingedämmt werden kann. Die Vakzinierung stellt jedoch einen deutlich besseren Schutz vor der Erkrankung dar. Sie ist auch für die Schweine das Hauptpräventionsmittel.

Diese Untersuchungen in der Maus und im Schwein geben zum ersten Mal Aufschluss über die Effizienz einer Oseltamivirtherapie gegen FLUAV mit potentiellen HA-Glykosylierungen an den AS-Positionen Asn158, Asn163 und Asn271 *in vivo*. Der Vergleich der Teste belegt, dass aus den erhobenen Daten zur Empfindlichkeit des swH1N2-Stammes gegenüber Oseltamivir in den zellkulturbasierten *In vitro*-Testen und in der Maus keine direkten Aussagen auf die Wirksamkeit der Substanz im natürlichen Wirt getroffen werden können. A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2) ist im murinen Modelltier genau wie in den zellkulturbasierten *In vitro*-Testen als relativ Oseltamivir-unempfindlich einzustufen. Im natürlichen Wirt hingegen konnte die Ausbildung von klinischen Symptomen und die Ausbreitung der Erkrankung über Tröpfcheninfektionen signifikant verringert werden. Das porzine H1N2-Isolat war Oseltamivir-sensitiv.

Leider bleibt die Ursache der unterschiedlichen Empfindlichkeit dieses Virus *in vitro* und *in vivo* ungeklärt. Womöglich spielen verschiedenste Wirtsfaktoren eine entscheidende Rolle in der NAI-Aktivität *in vivo*, zu deren Aufklärung es weiterer Untersuchungen bedarf.

Diese Arbeiten belegen erneut, dass es zur Beurteilung der NAI-Empfindlichkeit von FLUAV nicht ausreicht, die Suszeptibilität der NA zu untersuchen und/oder das virale Oberflächenprotein auf bekannte Resistenzmutationen hin zu analysieren. Vielmehr

bedarf es einer komplexeren Analyse der Isolate in geeigneten Modelltieren oder im natürlichen Wirt.

7.4 Einfluss der Rezeptorpräferenz der A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-Isolate auf die NAI-Empfindlichkeit *in vitro* und *in vivo*

Bereits seit vielen Jahren wird in der Literatur darauf hingewiesen, dass das gewählte Kultivierungssystem zur Selektion von Virusvarianten mit HA-Substitutionen in den AS rechts und links der Rezeptorbindungsstelle führen kann. Die so genannten „Ei-selektierten“ Varianten unterscheiden sich oft in ihrer Antigenität von den in Säugetierzellen vermehrten Viren.^{249, 250} Studien von Robertson *et al.*^{149, 251} und Katz *et al.*²⁵² zufolge sind die natürlich auftretenden humanen Influenza-A- und B-Viren relativ homogen in ihren HA-Sequenzen und stimmen am besten mit in MDCK-Zellen vermehrten Viren überein. Durch Adaptationen an das embryonierte Hühnerei entstehen Varianten mit Substitutionen an mindestens einer HA-AS-Position,^{148, 250, 251} die nur einen sehr geringen Anteil in den klinischen Proben darstellen. Ito *et al.* konnten zeigen, dass mehr als zwei Passagen im embryonierten Hühnerei zu einem Wechsel in der Rezeptorbindungspräferenz der huFLUAV an $\alpha 2,3$ -verknüpfte Sialinsäurerezeptoren führen.¹⁵⁰

Mit A/swine/Belzig/2/01 (H1N1) wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein swH1N1-Isolat untersucht, bei dem aufgrund unterschiedlicher Zellkulturpassagen Varianten selektiert wurden, die sich sowohl phäno- als auch genotypisch unterscheiden. Phänotypisch waren die beiden Varianten im Wachstum auf $\alpha 2,6$ -negativen MDBK-Zellen verschieden (Abbildung 3). Das in diesen Zellen vermehrte FLUAV A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“ replizierte mit signifikant höheren Virustitern als die auf MDCK-Zellen vermehrte Variante A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“. Hingegen unterschieden sich die beiden Isolate nicht signifikant in ihrem Replikationsverhalten in MDCK- und NHBE-Zellen ($\alpha 2,3/\alpha 2,6$ -Verhältnis gleich). Diese Daten und die sehr gute Hämagglutination von Hühnererythrozyten bei 37 °C (Tabelle 27) deuteten auf eine Präferenz von A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“ für $\alpha 2,3$ -Rezeptoren hin. Im Gegensatz dazu bindet A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ weniger gut an $\alpha 2,3$ -verknüpfte Sialinsäurereste. Dafür spricht auch die schlechte Hämagglutination bei 4 °C und der Verlust dieser Eigenschaft bei 37 °C (Tabelle 27).

Durch die genotypischen Analysen konnte nachgewiesen werden, dass sich die beiden Stämme in den AS-Positionen 138 und 225 des HA-Oberflächenproteins unterscheiden. Diese AS sind Bestandteile der Sekundärstrukturen der Rezeptorbindungsstelle (130

loop: AS 135 – 138, 220 *loop*: AS 221 – 228).¹⁷ Während A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ A138 und E225 exprimiert, ist A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“ mit Doppelsequenzen an diesen Stellen (A/S138 und E/G225) inhomogen.

Für klinische Isolate wurde die Substitution D225G im Zusammenhang mit der Adaptation an das Hühnerei beschrieben,¹⁴⁸ wodurch eine Bindung an α 2,3-verknüpfte Sialinsäuren ermöglicht wird.²⁵³ Die hohe Präferenz von A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“ gegenüber diesen Rezeptoren spricht dafür, dass die Vermehrung in MDBK-Zellen ähnlich zu den zuvor beschriebenen Passagen im embryonierten Hühnerei Virusvarianten mit veränderten Bindungseigenschaften selektierte. Es wird vermutet, dass Viren mit G225 eine zusätzliche Vertiefung in der Rezeptorbindetasche bilden, die für mehr Flexibilität bei der Bindung an Sialinsäuren verantwortlich ist.²⁵⁴ Änderungen in der Rezeptorpräferenz wurden mehrfach in der Literatur beschrieben. Untersuchungen von 117 klinischen A/H1N1v-Isolaten in Hong Kong wiesen beispielsweise bei 12,5 % der Patienten mit schwerwiegenden Erkrankungen die Mutation D225G nach.²⁵⁵ Auch bei der Pandemie von 1918 wurden veränderte Affinitäten bedingt durch Mutationen in den AS 190 und 225 des HA beschrieben.²⁹ Durch Glykan-Mikroarrays konnten Stevens *et al.* zeigen, dass die Substitutionen D190E oder D225G in der bevorzugten Bindung des 1918-Stammes an den aviären Rezeptor resultierten.²⁵⁴

Hingegen scheint das von A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ exprimierte E225 die Bindung an NeuAc α 2,3Gal-Reste zu schwächen. Morishita *et al.* führten den Nachweis, dass der G225D-Austausch bei huH1N1-FLUAV eine drastische Reduktion in der viralen Hämagglutinationsfähigkeit von Hühnererythrozyten bedingt.²³² In der vorliegenden Arbeit konnte dies für die zellkulturbasierten Untersuchungen ausgewählten huFLUAV und *human-like* swH1N2-FLUAV experimentell bestätigt werden (Tabellen 4 – 6 und 26). Da Glutamat (E) und Aspartat (D) zur Gruppe der sauren AS gehören, ist davon auszugehen, dass auch die E225 Substitution des „Berlin“-Stammes eine geringe Bindungsaffinität dieses Isolates an Hühnererythrozyten bedingt. In kristallografischen Untersuchungen humaner und porciner H1-FLUAV konnten zudem Wasserstoffbrückenbindungen zwischen D225 und der über α 2,6-Bindungen an die Sialinsäure verknüpften Galaktose nachgewiesen werden.^{226, 256} Es kann vermutet werden, dass auch das in diesem Isolat exprimierte Glutamat derartige Bindungen zum α 2,6-Rezeptor eingeht und darin seine geringere α 2,3-Affinität begründet liegt.

Generell sind die AS 138, 190, 194, 225, 226 und 228 der HA1-Untereinheit für die virale Bindung an den zellulären Rezeptor von Bedeutung.¹⁷ Diese Positionen sind unter den aviären FLUAV hochkonserviert. Durch Substitutionen können huFLUAV an α 2,6-Rezeptoren binden.²²⁸ So ist das Alanin in AS-Position 138 ein spezifisches Merkmal der aviären FLUAV.²²⁹ Die huH1N1-FLUAV haben womöglich durch die Substitution A138S

die Eigenschaft an $\alpha 2,3$ -Rezeptoren zu binden, verloren.²⁵⁷ Strukturell sind Interaktionen zwischen S138 und dem Q226 möglich, wodurch eine niedrigere Position von Q226 begünstigt und somit die Bindung an den aviären Rezeptor verhindert wird.²²⁶ Entsprechend Rogers *et al.* binden Viren wie A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ mit A138 sowohl an $\alpha 2,3$ - als auch an $\alpha 2,6$ -verknüpfte Sialinsäurereste, wohingegen S138 nur noch eine Bindung an $\alpha 2,6$ -Rezeptoren ermöglicht.²⁵⁷ Die Tatsache, dass das A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“ sehr gut an 2,3-Rezeptoren bindet lässt sich nur dadurch erklären, dass in dem Virusgemisch verhältnismäßig mehr Viren mit G225 und A138 vorliegen müssten.

Weiterhin unterschieden sich die beiden A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-Isolate in den zellkulturbasierten Untersuchungen in ihrer NAI-Empfindlichkeit (Tabelle 27). Sowohl in MDCK- als auch in ausdifferenzierten NHBE-Zellen war A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ um mehr als das 20fache unempfindlicher gegenüber Oseltamivir als A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“.

Viren mit der bei A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ detektierten E225-Substitution wurden auch nach Oseltamivirbehandlung bei Mäusen²⁴⁶ und Patienten²⁵⁵ isoliert. Bei den Mäusen trat die Mutation zusammen mit R292L und T464A im NA sowie V193A in der HA2-Untereinheit auf.²⁴⁶ Genau wie A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ erwiesen sich Klone mit diesen Veränderungen als hochresistent gegenüber Oseltamivir in MDCK-Zellen. Substitutionen an der AS 225 der HA1-Untereinheit sind sehr wahrscheinlich für Resistenzen in der Zellkultur verantwortlich, da sie die HA-Bindung an den zellulären Rezeptor vermindern, wodurch die Abhängigkeit von der viralen NA und somit die NAI-Empfindlichkeit *in vitro* reduziert werden. Auch Gubareva *et al.* konnten aus Oseltamivir-behandelten Testpersonen Viren mit Substitutionen an dieser Position isolieren, die in MDCK-Zellen einen Oseltamivir-resistenten Phänotyp aufwiesen.¹⁷⁸ Leider kann keine definitive Aussage dazu getroffen werden, ob A/swine/Belzig/2/01 (H1N1) aus einem Oseltamivir-behandelten Schwein isoliert wurde. Doch ist eine antivirale Therapie in diesen Tieren sehr unwahrscheinlich. Somit könnte die bei diesem Isolat nachgewiesene E225-Substitution auch eine natürliche Variation an dieser AS-Position darstellen.

Bisher sind keine *In vivo*-Daten zur NAI-Empfindlichkeit von FLUAV mit diesen HA-Substitutionen bekannt, weshalb die Effizienz der Oseltamivirtherapie gegen die A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-Isolate „Berlin“ und „Dessau“ in der Maus im Rahmen der vorliegenden Dissertation verglichen werden sollte.

Die Ergebnisse dieser Versuche belegen, dass sich die beiden A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-Isolate auch *in vivo* in ihrer Oseltamivirempfindlichkeit unterscheiden. So wie in Untersuchungen mit dem swFLUAV A/swine/Potsdam/15/81²¹⁰ und in Studien anderer

Arbeitsgruppen^{192, 240, 241, 245} konnte durch die Behandlung bei beiden Varianten der letale Ausgang der Infektion verhindert werden. Zudem wirkte sich die Oseltamivirtherapie positiv auf das Körpergewicht und das Allgemeinbefinden der behandelten Tiere aus und die Dauer der Erkrankung wurde reduziert (siehe Punkt 6.3.2). Während jedoch die Körpergewichtsverluste der Tiere zwischen den substanz- und placebobehandelten Gruppen der A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“-infizierten Mäuse nur an den Tagen 5 und 6 p. i. signifikant verschieden waren, konnten bedeutsame Unterschiede zwischen diesen beiden Gruppen bei den A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“-infizierten Tieren über einen Zeitraum von sechs Tagen verzeichnet werden (Abbildung 12). Weiterhin wurden differente Wirkungen der Oseltamivirtherapie auf das Allgemeinbefinden und die Krankheitsdauer beobachtet. Die klinische Symptomatik der A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“-Infektion konnte durch die Substanzbehandlung nur an zwei Tagen signifikant verbessert werden, während sich die A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“-infizierten Tiere unter Therapie über einen Zeitraum von sieben Tagen deutlich zu den unbehandelten Mäusen unterschieden (Abbildung 13). Die Krankheitsdauer wurde bei diesem Isolat hochsignifikant um $3,38 \pm 1,77$ Tage auf insgesamt zehn Tage und bei A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ nur um $2,5 \pm 1,91$ Tage auf insgesamt neun Tage reduziert. Zusätzlich bewirkte Oseltamivir eine signifikante Reduktion der Virustiter in den Lungen A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“-infizierter Tiere am Tag 4 p. i. Diese Wirkung auf die Viruslast wurde bereits in anderen Studien beschrieben^{193, 208, 241, 246} und bestätigte die gute Empfindlichkeit des „Dessau“-Isolates gegenüber dem NAI *in vivo*.

Diese Ergebnisse belegen, dass durch die Adaptation an den zellulären Rezeptor die NAI-Empfindlichkeit von FLUAV beeinflusst werden kann. Wie zuvor für A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2) gezeigt, können anhand der Untersuchungen in der Maus keine Aussagen auf die NAI-Empfindlichkeit der swFLUAV im natürlichen Wirt getroffen werden. Dennoch konnten die in diesem Modell erhobenen Daten zur Oseltamivirtherapie der beiden A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-Varianten die *In vitro*-Ergebnisse bestätigen. A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ war auch in der Maus weniger Oseltamivir-empfindlich als A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“. Dieser Unterschied beruht höchstwahrscheinlich auf der Substitution G225E in der HA1-Untereinheit. Aufgrund der nachgewiesenen Doppelsequenzen im HA-Glykoprotein bei A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Dessau“ an den AS-Positionen 138 und 225 kann an dieser Stelle nur vermutet werden, dass dieses FLUAV aufgrund seiner deutlich besseren Bindungseigenschaft an den in Mauslungen im Überschuss exprimierten $\alpha 2,3$ -Rezeptor stärker von der viralen NA anhängig ist und somit in seiner Replikation durch den NAI inhibiert wurde. A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ bindet wahrscheinlich durch die

225E-Substitution schwächer an die α 2,3-Rezeptoren und war dadurch weniger von einer funktionellen NA abhängig, wodurch auch die NAI-Empfindlichkeit ähnlich wie in den *In vitro*-Untersuchungen reduziert wurde.

Zur genaueren Analyse und Klärung des Resistenzmechanismus bedarf es weiterer Untersuchungen wie der Generation von FLUAV, deren HA die AS-Konstellationen A138/G225, A138/E225, S138/G225 und S138/E225 in einem definierten genetischen Hintergrund enthalten und deren Testung sowohl in der Zellkultur als auch im natürlichen Wirt.

In der vorliegenden Dissertation wurden mit A/swine/Bakum/1832/00 (H1N2) und A/swine/Belzig/2/01 (H1N1)-„Berlin“ zwei swFLUAV untersucht, die aufgrund von Substitutionen im HA sowohl *in vitro* als auch in der Maus NAI-unempfindlich waren. Die Daten belegen erneut, dass bei der Resistenzentwicklung gegenüber dieser Substanzklasse nicht nur Veränderungen im NA-Oberflächenprotein von Bedeutung sind. Vielmehr ist auch die Rezeptoraffinität des viralen HA-Glykoproteins essentiell für die NAI-Empfindlichkeit der swFLUAV – in der Zellkultur und auch *in vivo*.

Die zunehmenden Resistenzentwicklungen der FLUAV gegen die derzeit existierenden Virustatika sowie die eingeschränkte Wirksamkeit der NAI gegen FLUAV mit Veränderungen im HA unterstreichen den dringenden Bedarf an neuen Behandlungsansätzen. Eine Vielzahl an Reviews geben einen Ausblick auf die Therapiemöglichkeiten mit neu entwickelten Substanzklassen.^{98, 196, 258} So stellt die virale RNA-Polymerase z. B. das Target für T-705 dar, welches sich gegenwärtig in der klinischen Testphase II befindet. In einer Studie von Itoh *et al.* wurde für diese Substanz sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine gute Aktivität gegen pandemische A/H1N1v-Isolate nachgewiesen.²¹⁴ Ribavirin, ein weiterer Inhibitor der viralen RNA-Polymerase zeigte ebenfalls eine gute Aktivität gegen FLUAV im Tiermodell. Ein viel versprechendes Medikament ist auch DAS181, welches durch Abspaltung der Oberflächenrezeptoren auf den Atemwegsepithelien die Virusbindung an die Zellen verhindert. Diese Substanz wirkte im murinen Tiermodell sowohl prophylaktisch als auch therapeutisch gegen HPAIV vom Subtyp H5N1.²⁵⁹ Vor allem die Kombinationstherapie mit Wirkstoffen unterschiedlicher Targets soll zukünftig, ähnlich zu den Erfahrungen mit dem HI-Virus, der Resistenzentwicklung entgegenwirken und die Effizienz der Influenzatherapie erhöhen. Die im Ergebnis dieser Dissertation etablierten *In vitro*- und *In vivo*-Modelle können zukünftig auch für die Testung dieser neuen Substanzklassen gegenüber den swFLUAV eingesetzt werden.

Literaturverzeichnis

1. Fauquet, C. M., Mayo, A. M., Maniloff, J., Desselberger, U. & Ball, L. A. Virus Taxonomy VIII (Elsevier Academic Press, California, USA, 2005).
2. Leahy, M. B., Dessens, J. T., Weber, F., Kochs, G. & Nuttall, P. A. The fourth genus in the Orthomyxoviridae: sequence analyses of two Thogoto virus polymerase proteins and comparison with influenza viruses. *Virus Res* 50, 215-24 (1997).
3. Mjaaland, S., Rimstad, E., Falk, K. & Dannevig, B. H. Genomic characterization of the virus causing infectious salmon anemia in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): an orthomyxo-like virus in a teleost. *J Virol* 71, 7681-6 (1997).
4. Palese, P. & Shaw, M. L. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication (eds. Knipe, D. M. & Howley, P. M.) (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007).
5. Nelson, M. I. & Holmes, E. C. The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet* 8, 196-205 (2007).
6. Bouvier, N. M. & Palese, P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26 Suppl 4, D49-53 (2008).
7. Baudin, F., Bach, C., Cusack, S. & Ruigrok, R. W. Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *Embo J* 13, 3158-65 (1994).
8. Wise, H. M. et al. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol* 83, 8021-31 (2009).
9. Weis, W. et al. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* 333, 426-31 (1988).
10. Stegmann, T. Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. *Traffic* 1, 598-604 (2000).
11. Bui, M., Whittaker, G. & Helenius, A. Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J Virol* 70, 8391-401 (1996).
12. Martin, K. & Helenius, A. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J Virol* 65, 232-44 (1991).
13. Wiley, D. C. & Skehel, J. J. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem* 56, 365-94 (1987).
14. Gomez-Puertas, P., Albo, C., Perez-Pastrana, E., Vivo, A. & Portela, A. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol* 74, 11538-47 (2000).
15. Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T. & Kawaoka, Y. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2002-7 (2003).
16. Wagner, R., Matrosovich, M. & Klenk, H. D. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol* 12, 159-66 (2002).
17. Skehel, J. J. & Wiley, D. C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69, 531-69 (2000).
18. Colman, P. M., Hoyne, P. A. & Lawrence, M. C. Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *J Virol* 67, 2972-80 (1993).
19. Russell, R. J. et al. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design. *Nature* 443, 45-9 (2006).
20. Pinto, L. H. & Lamb, R. A. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J Biol Chem* 281, 8997-9000 (2006).
21. Fouchier, R. A. et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 79, 2814-22 (2005).

22. Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M. & Kawaoka, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* 56, 152-79 (1992).
23. Wright, P. F., Neumann, G. & Kawaoka, Y. Orthomyxoviruses (eds. Knipe, D. M. & Howley, P. M.) (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007).
24. Monto, A. S. Epidemiology of influenza. *Vaccine* 26 Suppl 4, D45-8 (2008).
25. Steinhauer, D. A. & Skehel, J. J. Genetics of influenza viruses. *Annu Rev Genet* 36, 305-32 (2002).
26. Parvin, J. D., Moscona, A., Pan, W. T., Leider, J. M. & Palese, P. Measurement of the mutation rates of animal viruses: influenza A virus and poliovirus type 1. *J Virol* 59, 377-83 (1986).
27. Kilbourne, E. D. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg Infect Dis* 12, 9-14 (2006).
28. Taubenberger, J. K. & Morens, D. M. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis* 12, 15-22 (2006).
29. Glaser, L. et al. A single amino acid substitution in 1918 influenza virus hemagglutinin changes receptor binding specificity. *J Virol* 79, 11533-6 (2005).
30. Scholtissek, C., Rohde, W., Von Hoyningen, V. & Rott, R. On the origin of the human influenza virus subtypes H2N2 and H3N2. *Virology* 87, 13-20 (1978).
31. Kawaoka, Y., Krauss, S. & Webster, R. G. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* 63, 4603-8 (1989).
32. Gregory, V. et al. Emergence of influenza A H1N2 reassortant viruses in the human population during 2001. *Virology* 300, 1-7 (2002).
33. Webster, R. G., Yakhno, M., Hinshaw, V. S., Bean, W. J. & Murti, K. G. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84, 268-78 (1978).
34. Kida, H., Yanagawa, R. & Matsuoka, Y. Duck influenza lacking evidence of disease signs and immune response. *Infect Immun* 30, 547-53 (1980).
35. Hinshaw, V. S., Webster, R. G. & Turner, B. Water-bone transmission of influenza A viruses? *Intervirology* 11, 66-8 (1979).
36. Capua, I. & Alexander, D. J. The challenge of avian influenza to the veterinary community. *Avian Pathol* 35, 189-205 (2006).
37. Harder, T. C. & Werner, O. Avian Influenza (eds. Kamps, B., Hoffmann, C. & Preiser, W.) (2006).
38. WHO. H5N1 avian influenza: Timeline of major events. 23 March 2009. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/ai_timeline/en/index.html. (2009).
39. WHO. Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A(H5N1) Reported to WHO. 19 November 2010. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_11_19/en/index.html. (2010).
40. Suzuki, Y. Sialobiology of influenza: molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol Pharm Bull* 28, 399-408 (2005).
41. Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A. & Klenk, H. D. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4620-4 (2004).
42. Kumlin, U., Olofsson, S., Dimock, K. & Arnberg, N. Sialic acid tissue distribution and influenza virus tropism. *Influenza Other Respi Viruses* 2, 147-54 (2008).
43. Kida, H. et al. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J Gen Virol* 75 (Pt 9), 2183-8 (1994).
44. Ito, T. et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol* 72, 7367-73 (1998).
45. Hinshaw, V. S., Webster, R. G., Easterday, B. C. & Bean, W. J., Jr. Replication of avian influenza A viruses in mammals. *Infect Immun* 34, 354-61 (1981).

46. Kuntz-Simon, G. & Madec, F. Genetic and Antigenic Evolution of Swine Influenza Viruses in Europe and Evaluation of Their Zoonotic Potential. *Zoonoses Public Health* (2009).
47. Brockwell-Staats, C., Webster, R. G. & Webby, R. J. Diversity of Influenza Viruses in Swine and the Emergence of a Novel Human Pandemic Influenza A (H1N1). *Influenza Other Respi Viruses* 3, 207-213 (2009).
48. Zimmer, S. M. & Burke, D. S. Historical perspective--Emergence of influenza A (H1N1) viruses. *N Engl J Med* 361, 279-85 (2009).
49. Suess, J. & Schrader, C. [Influenza--a classical viral zoonosis]. *Pneumologie* 58, 272-3 (2004).
50. Schrader, C. & Suess, J. Genetic characterization of a porcine H1N2 influenza virus strain isolated in Germany. *Intervirology* 46, 66-70 (2003).
51. Schrader, C. & Suess, J. Molecular epidemiology of porcine H3N2 influenza A viruses isolated in Germany between 1982 and 2001. *Intervirology* 47, 72-7 (2004).
52. de Jong, J. C. et al. Antigenic and genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in Europe. *J Virol* 81, 4315-22 (2007).
53. Zell, R. et al. Novel reassortant of swine influenza H1N2 virus in Germany. *J Gen Virol* 89, 271-6 (2008).
54. Zell, R., Bergmann, S., Krumbholz, A., Wutzler, P. & Durrwald, R. Ongoing evolution of swine influenza viruses: a novel reassortant. *Arch Virol* 153, 2085-92 (2008).
55. Myers, K. P., Olsen, C. W. & Gray, G. C. Cases of swine influenza in humans: a review of the literature. *Clin Infect Dis* 44, 1084-8 (2007).
56. Adiego Sancho, B. et al. Human case of swine influenza A (H1N1), Aragon, Spain, November 2008. *Euro Surveill* 14 (2009).
57. Claas, E. C., Kawaoka, Y., de Jong, J. C., Masurel, N. & Webster, R. G. Infection of children with avian-human reassortant influenza virus from pigs in Europe. *Virology* 204, 453-7 (1994).
58. Rimmelzwaan, G. F. et al. Antigenic and genetic characterization of swine influenza A (H1N1) viruses isolated from pneumonia patients in The Netherlands. *Virology* 282, 301-6 (2001).
59. de Jong, J. C. et al. Isolation of swine-like influenza A(H1N1) viruses from man in Switzerland and The Netherlands. *Ann Inst Pasteur Virol* 139, 429-37 (1988).
60. Gregory, V. et al. Human infection by a swine influenza A (H1N1) virus in Switzerland. *Arch Virol* 148, 793-802 (2003).
61. Gregory, V. et al. Infection of a child in Hong Kong by an influenza A H3N2 virus closely related to viruses circulating in European pigs. *J Gen Virol* 82, 1397-406 (2001).
62. Krumbholz, A. et al. Prevalence of antibodies to swine influenza viruses in humans with occupational exposure to pigs, Thuringia, Germany, 2008-2009. *J Med Virol* 82, 1617-25 (2010).
63. Olsen, C. W. et al. Serologic evidence of H1 swine Influenza virus infection in swine farm residents and employees. *Emerg Infect Dis* 8, 814-9 (2002).
64. Shinde, V. et al. Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009. *N Engl J Med* 360, 2616-25 (2009).
65. Chang, L. Y., Shih, S. R., Shao, P. L., Huang, D. T. & Huang, L. M. Novel Swine-origin Influenza Virus A (H1N1): The First Pandemic of the 21st Century. *J Formos Med Assoc* 108, 526-32 (2009).
66. WHO. Pandemic (H1N1) 2009: Update 112. http://www.who.int/csr/don/2010_08_06/en/index.html. (2010).
67. Buda, S. et al. Influenza-Monatsbericht - Kalenderwoche 16 bis 19 (17.04. bis 14.05.2010). http://influenza.rki.de/Wochenberichte/2009_2010/2010-19.pdf. (2010).

68. Cohen, J. Pandemic influenza. Straight from the pig's mouth: swine research with swine influenzas. *Science* 325, 140-1 (2009).
69. Garten, R. J. et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science* 325, 197-201 (2009).
70. Smith, G. J. et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature* 459, 1122-5 (2009).
71. Kingsford, C., Nagarajan, N. & Salzberg, S. L. 2009 Swine-origin influenza A (H1N1) resembles previous influenza isolates. *PLoS One* 4, e6402 (2009).
72. Kuiken, T. & Taubenberger, J. K. Pathology of human influenza revisited. *Vaccine* 26 Suppl 4, D59-66 (2008).
73. Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A. & Klenk, H. D. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol* 78, 12665-7 (2004).
74. Pschyrembel, W. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch* (ed. Pschyrembel, W. P. K. W., 1745 pp. 258., neu bearbeitete Auflage ed, edited by H. Hildebrandt, 258. Walter de Gruyter, Berlin.) (1998).
75. Kao, H. T., Huang, Y. C. & Lin, T. Y. Influenza A virus infection in infants. *J Microbiol Immunol Infect* 33, 105-8 (2000).
76. Hu, J. J. et al. Clinical features of influenza A and B in children and association with myositis. *J Microbiol Immunol Infect* 37, 95-8 (2004).
77. Luria, D. B., Blumenfeld, H. L., Ellis, J. T., Kilbourne, E. D. & Rogers, D. E. Studies on influenza in the pandemic of 1957-1958. II. Pulmonary complications of influenza. *J Clin Invest* 38, 213-65 (1959).
78. Scheiblaue, H., Reinacher, M., Tashiro, M. & Rott, R. Interactions between bacteria and influenza A virus in the development of influenza pneumonia. *J Infect Dis* 166, 783-91 (1992).
79. Stohr, K. Influenza--WHO cares. *Lancet Infect Dis* 2, 517 (2002).
80. Wutzler, P. Wie gefährlich ist die Schweinegrippe? Abendvorlesung am Universitätsklinikum Jena am 08.07.2009. (2009).
81. STIKO. Influenza-assoziierte Mortalität in Deutschland 1985-2006. *Epidemiologisches Bulletin* 35 (2007).
82. Shinya, K. et al. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. *Nature* 440, 435-6 (2006).
83. Uyeki, T. M. Human infection with highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus: review of clinical issues. *Clin Infect Dis* 49, 279-90 (2009).
84. Bautista, E. et al. Clinical aspects of pandemic 2009 influenza A (H1N1) virus infection. *N Engl J Med* 362, 1708-19 (2010).
85. Julkunen, I. et al. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 171-80 (2001).
86. Hayden, F. G. et al. Local and systemic cytokine responses during experimental human influenza A virus infection. Relation to symptom formation and host defense. *J Clin Invest* 101, 643-9 (1998).
87. WHO. WHO information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 virus in humans - revised, 23 November 2009.
http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/diagnostic_recommendation/en/index.html. (2009).
88. Couch, R. B. Seasonal inactivated influenza virus vaccines. *Vaccine* 26 Suppl 4, D5-9 (2008).
89. Nicholson, K. G., Snacken, R. & Palache, A. M. Influenza immunization policies in Europe and the United States. *Vaccine* 13, 365-9 (1995).
90. Kemble, G. & Greenberg, H. Novel generations of influenza vaccines. *Vaccine* 21, 1789-95 (2003).
91. Lange, W. in *Influenza. Klinik, Virologie, Epidemiologie, Therapie und Prophylaxe* (eds. Lange, W. & Vogel, G. E.) 123-152 (ABW Wissenschaftsverlag, 2004).

92. Russell, C. A. et al. Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses. *Vaccine* 26 Suppl 4, D31-4 (2008).
93. WHO. Recommended viruses for influenza vaccines for use in the 2010-2011 northern hemisphere influenza season.
http://www.who.int/csr/disease/influenza/recommendations2010_11north/en/index.html. (2010).
94. Audsley, J. M. & Tannock, G. A. Cell-based influenza vaccines: progress to date. *Drugs* 68, 1483-91 (2008).
95. Liu, J., Shi, X., Schwartz, R. & Kemble, G. Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine. *Vaccine* (2009).
96. Monto, A. S. et al. Influenza control in the 21st century: Optimizing protection of older adults. *Vaccine* (2009).
97. Girard, M. P., Tam, J. S., Assossou, O. M. & Kieny, M. P. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine* 28, 4895-902 (2010).
98. De Clercq, E. Antiviral agents active against influenza A viruses. *Nat Rev Drug Discov* 5, 1015-25 (2006).
99. Wutzler, P. et al. Antiviral treatment and prophylaxis of influenza in primary care: German recommendations. *J Clin Virol* 31, 84-91 (2004).
100. Hay, A. J., Wolstenholme, A. J., Skehel, J. J. & Smith, M. H. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *Embo J* 4, 3021-4 (1985).
101. Hay, A. J. The action of amantanamines against influenza A viruses: inhibition of the M2 ion channel protein. *seminars in VIROLOGY* 3, 21-30 (1992).
102. Kendal, A. P. & Klenk, H. D. Amantadine inhibits an early, M2 protein-dependent event in the replication cycle of avian influenza (H7) viruses. *Arch Virol* 119, 265-73 (1991).
103. Hayden, F. G. Antivirals for influenza: historical perspectives and lessons learned. *Antiviral Res* 71, 372-8 (2006).
104. Shiraishi, K. et al. High frequency of resistant viruses harboring different mutations in amantadine-treated children with influenza. *J Infect Dis* 188, 57-61 (2003).
105. Hayden, F. G. & Hay, A. J. Emergence and transmission of influenza A viruses resistant to amantadine and rimantadine. *Curr Top Microbiol Immunol* 176, 119-30 (1992).
106. Abed, Y., Goyette, N. & Boivin, G. Generation and characterization of recombinant influenza A (H1N1) viruses harboring amantadine resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 556-9 (2005).
107. Schnell, J. R. & Chou, J. J. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. *Nature* 451, 591-5 (2008).
108. Stouffer, A. L. et al. Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel. *Nature* 451, 596-9 (2008).
109. Stouffer, A. L. et al. The interplay of functional tuning, drug resistance, and thermodynamic stability in the evolution of the M2 proton channel from the influenza A virus. *Structure* 16, 1067-76 (2008).
110. Ziegler, T. et al. Low incidence of rimantadine resistance in field isolates of influenza A viruses. *J Infect Dis* 180, 935-9 (1999).
111. Suzuki, H. et al. Emergence of amantadine-resistant influenza A viruses: epidemiological study. *J Infect Chemother* 9, 195-200 (2003).
112. Bright, R. A. et al. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern. *Lancet* 366, 1175-81 (2005).
113. Saito, R. et al. High prevalence of amantadine-resistance influenza a (H3N2) in six prefectures, Japan, in the 2005-2006 Season. *J Med Virol* 79, 1569-76 (2007).
114. Barr, I. G. et al. Increased adamantane resistance in influenza A(H3) viruses in Australia and neighbouring countries in 2005. *Antiviral Res* 73, 112-7 (2007).
115. Deyde, V. M. et al. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J Infect Dis* 196, 249-57 (2007).

116. Schmidtke, M., Bauer, K., Ludwig, N. & Wutzler, P. Emergence and phylogenetic relationships of amantadine-resistant human H3N2 influenza A viruses in Germany in the season 2005/2006. *Int J Antimicrob Agents* 32, 192-5 (2008).
117. Barr, I. G. et al. The emergence of adamantane resistance in influenza A(H1) viruses in Australia and regionally in 2006. *Antiviral Res* 75, 173-6 (2007).
118. Simonsen, L. et al. The genesis and spread of reassortment human influenza A/H3N2 viruses conferring adamantane resistance. *Mol Biol Evol* 24, 1811-20 (2007).
119. Nelson, M. I., Simonsen, L., Viboud, C., Miller, M. A. & Holmes, E. C. The origin and global emergence of adamantane resistant A/H3N2 influenza viruses. *Virology* 388, 270-8 (2009).
120. Cheung, C. L. et al. Distribution of amantadine-resistant H5N1 avian influenza variants in Asia. *J Infect Dis* 193, 1626-9 (2006).
121. Puthavathana, P. et al. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J Gen Virol* 86, 423-33 (2005).
122. Ilyushina, N. A., Govorkova, E. A. & Webster, R. G. Detection of amantadine-resistant variants among avian influenza viruses isolated in North America and Asia. *Virology* 341, 102-6 (2005).
123. Moscona, A. Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med* 353, 1363-73 (2005).
124. McKimm-Breschkin, J. et al. Neuraminidase sequence analysis and susceptibilities of influenza virus clinical isolates to zanamivir and oseltamivir. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2264-72 (2003).
125. McKimm-Breschkin, J. L. Resistance of influenza viruses to neuraminidase inhibitors--a review. *Antiviral Res* 47, 1-17 (2000).
126. Monto, A. S. et al. Detection of influenza viruses resistant to neuraminidase inhibitors in global surveillance during the first 3 years of their use. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 2395-402 (2006).
127. Gubareva, L. V., Matrosovich, M. N., Brenner, M. K., Bethell, R. C. & Webster, R. G. Evidence for zanamivir resistance in an immunocompromised child infected with influenza B virus. *J Infect Dis* 178, 1257-62 (1998).
128. Hurt, A. C. et al. Identification of a human influenza type B strain with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitor drugs. *Virus Res* 103, 205-11 (2004).
129. Roberts, N. A. Treatment of influenza with neuraminidase inhibitors: virological implications. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 1895-7 (2001).
130. Ward, P., Small, I., Smith, J., Suter, P. & Dutkowsky, R. Oseltamivir (Tamiflu) and its potential for use in the event of an influenza pandemic. *J Antimicrob Chemother* 55 Suppl 1, i5-i21 (2005).
131. Whitley, R. J. et al. Oral oseltamivir treatment of influenza in children. *Pediatr Infect Dis J* 20, 127-33 (2001).
132. Kiso, M. et al. Resistant influenza A viruses in children treated with oseltamivir: descriptive study. *Lancet* 364, 759-65 (2004).
133. Lackenby, A. et al. Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe. *Euro Surveill* 13 (2008).
134. WHO. Influenza A(H1N1) virus resistance to oseltamivir - Last quarter 2007 to 4 April 2008.
<http://www.who.int/csr/disease/influenza/H1N1ResistanceWeb20080403.pdf> (2008).
135. Moscona, A. Global transmission of oseltamivir-resistant influenza. *N Engl J Med* 360, 953-6 (2009).
136. Rameix-Welti, M. A. et al. Natural variation can significantly alter the sensitivity of influenza A (H5N1) viruses to oseltamivir. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 3809-15 (2006).

137. McKimm-Breschkin, J. L., Selleck, P. W., Usman, T. B. & Johnson, M. A. Reduced sensitivity of influenza A (H5N1) to oseltamivir. *Emerg Infect Dis* 13, 1354-7 (2007).
138. Lackenby, A., Thompson, C. I. & Democratis, J. The potential impact of neuraminidase inhibitor resistant influenza. *Curr Opin Infect Dis* 21, 626-38 (2008).
139. Ferraris, O. & Lina, B. Mutations of neuraminidase implicated in neuraminidase inhibitors resistance. *J Clin Virol* 41, 13-9 (2008).
140. Abed, Y., Goyette, N. & Boivin, G. A reverse genetics study of resistance to neuraminidase inhibitors in an influenza A/H1N1 virus. *Antivir Ther* 9, 577-81 (2004).
141. Gubareva, L. V., Kaiser, L. & Hayden, F. G. Influenza virus neuraminidase inhibitors. *Lancet* 355, 827-35 (2000).
142. Carr, J. et al. Influenza virus carrying neuraminidase with reduced sensitivity to oseltamivir carboxylate has altered properties in vitro and is compromised for infectivity and replicative ability in vivo. *Antiviral Res* 54, 79-88 (2002).
143. Gubareva, L. V. et al. Characterization of mutants of influenza A virus selected with the neuraminidase inhibitor 4-guanidino-Neu5Ac2en. *J Virol* 70, 1818-27 (1996).
144. Abed, Y. et al. Characterization of 2 influenza A(H3N2) clinical isolates with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors due to mutations in the hemagglutinin gene. *J Infect Dis* 186, 1074-80 (2002).
145. Mishin, V. P., Novikov, D., Hayden, F. G. & Gubareva, L. V. Effect of hemagglutinin glycosylation on influenza virus susceptibility to neuraminidase inhibitors. *J Virol* 79, 12416-24 (2005).
146. Wutzler, P. et al. Antivirale Therapie und Prophylaxe der Influenza. Empfehlungen der Konsensuskonferenz der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e. V. (PEG) und der Deutschen Vereinigung zur Bekämpfung der Viruskrankheiten e. V. (DVV). *Chemoter J* 12, 1-3 (2003).
147. Bauer, K. Untersuchungen zur Virustatikaresistenz von Schweine-Influenza-A-Viren vom Subtyp H3N2. Diplomarbeit Friedrich-Schiller-Universität Jena (2005).
148. Rocha, E. P. et al. Comparison of 10 influenza A (H1N1 and H3N2) haemagglutinin sequences obtained directly from clinical specimens to those of MDCK cell- and egg-grown viruses. *J Gen Virol* 74 (Pt 11), 2513-8 (1993).
149. Robertson, J. S. et al. Sequence analysis of the haemagglutinin (HA) of influenza A (H1N1) viruses present in clinical material and comparison with the HA of laboratory-derived virus. *J Gen Virol* 72 (Pt 11), 2671-7 (1991).
150. Ito, T. et al. Differences in sialic acid-galactose linkages in the chicken egg amnion and allantois influence human influenza virus receptor specificity and variant selection. *J Virol* 71, 3357-62 (1997).
151. Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R. G. & Perez, D. R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch Virol* 146, 2275-89 (2001).
152. Tokunaga, K., Taniguchi, H., Yoda, K., Shimizu, M. & Sakiyama, S. Nucleotide sequence of a full-length cDNA for mouse cytoskeletal beta-actin mRNA. *Nucleic Acids Res* 14, 2829 (1986).
153. Gray, T. E., Guzman, K., Davis, C. W., Abdullah, L. H. & Nettesheim, P. Mucociliary differentiation of serially passaged normal human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14, 104-12 (1996).
154. Reed, L. & Muench, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *The American Journal of Hygiene*, 493-497 (1938).
155. Hirst, G. K. The Agglutination Of Red Cells By Allantoic Fluid Of Chick Embryos Infected With Influenza Virus. *Science* 94, 22-23 (1941).
156. Schmidtke, M., Schnittler, U., Jahn, B., Dahse, H. & Stelzner, A. A rapid assay for evaluation of antiviral activity against coxsackie virus B3, influenza virus A, and herpes simplex virus type 1. *J Virol Methods* 95, 133-43 (2001).

157. Ilyushina, N. A., Govorkova, E. A., Gray, T. E., Bovin, N. V. & Webster, R. G. Human-like receptor specificity does not affect the neuraminidase-inhibitor susceptibility of H5N1 influenza viruses. *PLoS Pathog* 4, e1000043 (2008).
158. Mayr, A., Bachmann, P. A., Bibrack, B. & Wittmann, G. *Virologische Arbeitsmethoden Band II Serologie* (VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1977).
159. Payment, P. & Trudel, M. *Methods and Techniques in Virology* (Marcel Dekker, Inc., New York, 1993).
160. Klingel, K. et al. Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 314-8 (1992).
161. Gabriel, G. et al. Spread of infection and lymphocyte depletion in mice depends on polymerase of influenza virus. *Am J Pathol* 175, 1178-86 (2009).
162. Nicholls, J. M., Chan, R. W., Russell, R. J., Air, G. M. & Peiris, J. S. Evolving complexities of influenza virus and its receptors. *Trends Microbiol* 16, 149-57 (2008).
163. Ibricevic, A. et al. Influenza virus receptor specificity and cell tropism in mouse and human airway epithelial cells. *J Virol* 80, 7469-80 (2006).
164. Matrosovich, M., Matrosovich, T., Carr, J., Roberts, N. A. & Klenk, H. D. Overexpression of the alpha-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J Virol* 77, 8418-25 (2003).
165. Mullis, K. et al. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-73 (1986).
166. Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7 (1977).
167. Hall, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41, 95-98 (1999).
168. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-9 (2007).
169. Jones, D. T., Taylor, W. R. & Thornton, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput Appl Biosci* 8, 275-82 (1992).
170. Sheu, T. G. et al. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 3284-92 (2008).
171. Richardson, B. A. & Overbaugh, J. Basic statistical considerations in virological experiments. *J Virol* 79, 669-76 (2005).
172. Schmidtke, M. et al. Amantadine resistance among porcine H1N1, H1N2, and H3N2 influenza A viruses isolated in Germany between 1981 and 2001. *Intervirology* 49, 286-93 (2006).
173. Krumbholz, A. et al. High prevalence of amantadine resistance among circulating European porcine influenza A viruses. *J Gen Virol* 90, 900-8 (2009).
174. Potier, M., Mameli, L., Belisle, M., Dallaire, L. & Melancon, S. B. Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl-alpha-D-N-acetylneuraminate) substrate. *Anal Biochem* 94, 287-96 (1979).
175. Buxton, R. C. et al. Development of a sensitive chemiluminescent neuraminidase assay for the determination of influenza virus susceptibility to zanamivir. *Anal Biochem* 280, 291-300 (2000).
176. Wetherall, N. T. et al. Evaluation of neuraminidase enzyme assays using different substrates to measure susceptibility of influenza virus clinical isolates to neuraminidase inhibitors: report of the neuraminidase inhibitor susceptibility network. *J Clin Microbiol* 41, 742-50 (2003).
177. Bauer, K., Richter, M., Wutzler, P. & Schmidtke, M. Different neuraminidase inhibitor susceptibilities of human H1N1, H1N2, and H3N2 influenza A viruses isolated in Germany from 2001 to 2005/2006. *Antiviral Res* 82, 34-41 (2009).

-
178. Gubareva, L. V., Kaiser, L., Matrosovich, M. N., Soo-Hoo, Y. & Hayden, F. G. Selection of influenza virus mutants in experimentally infected volunteers treated with oseltamivir. *J Infect Dis* 183, 523-31 (2001).
 179. Ilyushina, N. A., Bovin, N. V., Webster, R. G. & Govorkova, E. A. Combination chemotherapy, a potential strategy for reducing the emergence of drug-resistant influenza A variants. *Antiviral Res* 70, 121-31 (2006).
 180. Baz, M., Abed, Y. & Boivin, G. Characterization of drug-resistant recombinant influenza A/H1N1 viruses selected in vitro with peramivir and zanamivir. *Antiviral Res* 74, 159-62 (2007).
 181. Yen, H. L. et al. Neuraminidase inhibitor-resistant influenza viruses may differ substantially in fitness and transmissibility. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 4075-84 (2005).
 182. Hatakeyama, S. et al. Enhanced expression of an alpha2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves isolation of human influenza viruses and evaluation of their sensitivity to a neuraminidase inhibitor. *J Clin Microbiol* 43, 4139-46 (2005).
 183. Brown, I. H., Harris, P. A., McCauley, J. W. & Alexander, D. J. Multiple genetic reassortment of avian and human influenza A viruses in European pigs, resulting in the emergence of an H1N2 virus of novel genotype. *J Gen Virol* 79 (Pt 12), 2947-55 (1998).
 184. Brown, I. H., Chakraverty, P., Harris, P. A. & Alexander, D. J. Disease outbreaks in pigs in Great Britain due to an influenza A virus of H1N2 subtype. *Vet Rec* 136, 328-9 (1995).
 185. Scholtissek, C., Burger, H., Bachmann, P. A. & Hannoun, C. Genetic relatedness of hemagglutinins of the H1 subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds. *Virology* 129, 521-3 (1983).
 186. McKimm-Breschkin, J. L. et al. Mutations in a conserved residue in the influenza virus neuraminidase active site decreases sensitivity to Neu5Ac2en-derived inhibitors. *J Virol* 72, 2456-62 (1998).
 187. McKimm-Breschkin, J. L. et al. Generation and characterization of variants of NWS/G70C influenza virus after in vitro passage in 4-amino-Neu5Ac2en and 4-guanidino-Neu5Ac2en. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 40-6 (1996).
 188. Zambon, M. & Hayden, F. G. Position statement: global neuraminidase inhibitor susceptibility network. *Antiviral Res* 49, 147-56 (2001).
 189. Nobusawa, E. et al. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology* 182, 475-85 (1991).
 190. Barnard, D. L. Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy. *Antiviral Res* 82, A110-22 (2009).
 191. Masihi, K. N., Schweiger, B., Finsterbusch, T. & Hengel, H. Low dose oral combination chemoprophylaxis with oseltamivir and amantadine for influenza A virus infections in mice. *J Chemother* 19, 295-303 (2007).
 192. Mendel, D. B. et al. Oral administration of a prodrug of the influenza virus neuraminidase inhibitor GS 4071 protects mice and ferrets against influenza infection. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 640-6 (1998).
 193. Yen, H. L., Monto, A. S., Webster, R. G. & Govorkova, E. A. Virulence may determine the necessary duration and dosage of oseltamivir treatment for highly pathogenic A/Vietnam/1203/04 influenza virus in mice. *J Infect Dis* 192, 665-72 (2005).
 194. Wang, C., Takeuchi, K., Pinto, L. H. & Lamb, R. A. Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. *J Virol* 67, 5585-94 (1993).
 195. Bright, R. A., Shay, D. K., Shu, B., Cox, N. J. & Klimov, A. I. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *Jama* 295, 891-4 (2006).

196. Moss, R. B., Davey, R. T., Steigbigel, R. T. & Fang, F. Targeting pandemic influenza: a primer on influenza antivirals and drug resistance. *J Antimicrob Chemother* 65, 1086-93 (2010).
197. WHO. WHO guidelines for pharmacological management of pandemic (H1N1) 2009 influenza and other influenza viruses. February 2010. http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/h1n1_use_antivirals_20090820/en/index.html. (2010).
198. WHO. Clinical management of human infection with avian influenza A (H5N1) virus. 15 August 2007. http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/guidelines/clinicalmanage07/en/index.html. (2007).
199. Bauer, K., Schrader, C., Suess, J., Wutzler, P. & Schmidtke, M. Neuraminidase inhibitor susceptibility of porcine H3N2 influenza A viruses isolated in Germany between 1982 and 1999. *Antiviral Res* 75, 219-26 (2007).
200. Escuret, V. et al. Detection of human influenza A (H1N1) and B strains with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J Clin Virol* 41, 25-8 (2008).
201. Hurt, A. C., Barr, I. G., Hartel, G. & Hampson, A. W. Susceptibility of human influenza viruses from Australasia and South East Asia to the neuraminidase inhibitors zanamivir and oseltamivir. *Antiviral Res* 62, 37-45 (2004).
202. Ferraris, O., Kessler, N. & Lina, B. Sensitivity of influenza viruses to zanamivir and oseltamivir: a study performed on viruses circulating in France prior to the introduction of neuraminidase inhibitors in clinical practice. *Antiviral Res* 68, 43-8 (2005).
203. Mungall, B. A., Xu, X. & Klimov, A. Surveillance of influenza isolates for susceptibility to neuraminidase inhibitors during the 2000-2002 influenza seasons. *Virus Res* 103, 195-7 (2004).
204. Xu, X. et al. Intercontinental circulation of human influenza A(H1N2) reassortant viruses during the 2001-2002 influenza season. *J Infect Dis* 186, 1490-3 (2002).
205. Ellis, J. S. et al. Influenza AH1N2 viruses, United Kingdom, 2001-02 influenza season. *Emerg Infect Dis* 9, 304-10 (2003).
206. Cheng, L. S. et al. Ensemble-based virtual screening reveals potential novel antiviral compounds for avian influenza neuraminidase. *J Med Chem* 51, 3878-94 (2008).
207. Zhang, Q. et al. Binding interaction analysis of the active site and its inhibitors for neuraminidase (N1 subtype) of human influenza virus by the integration of molecular docking, FMO calculation and 3D-QSAR CoMFA modeling. *J Chem Inf Model* 48, 1802-12 (2008).
208. Ilyushina, N. A. et al. Oseltamivir-ribavirin combination therapy for highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 3889-97 (2008).
209. Sidwell, R. W. et al. Influence of virus strain, challenge dose, and time of therapy initiation on the in vivo influenza inhibitory effects of RWJ-270201. *Antiviral Res* 51, 179-87 (2001).
210. Topf, D. Vergleichende Untersuchungen zur Pathogenität und Oseltamivirempfindlichkeit von A/swine/Potsdam/15/81 in vivo. Diplomarbeit Friedrich-Schiller-Universität Jena (2010).
211. Duwe, S. & Schweiger, B. A new and rapid genotypic assay for the detection of neuraminidase inhibitor resistant influenza A viruses of subtype H1N1, H3N2, and H5N1. *J Virol Methods* 153, 134-41 (2008).
212. Deyde, V. M. et al. Detection of molecular markers of antiviral resistance in influenza A (H5N1) viruses using a pyrosequencing method. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 1039-47 (2009).
213. Grienke, U. et al. Antiviral potential and molecular insight into neuraminidase inhibiting diarylheptanoids from *Alpinia katsumadai*. *J Med Chem* 53, 778-86 (2010).

-
214. Itoh, Y. et al. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. *Nature* 460, 1021-5 (2009).
 215. Leung, T. W., Tai, A. L., Cheng, P. K., Kong, M. S. & Lim, W. Detection of an oseltamivir-resistant pandemic influenza A/H1N1 virus in Hong Kong. *J Clin Virol* 46, 298-9 (2009).
 216. Duwe, S. C., Wedde, M., Birkner, P. & Schweiger, B. Genotypic and phenotypic resistance of pandemic A/H1N1 influenza viruses circulating in Germany. *Antiviral Res* (2010).
 217. Hurt, A. C., Holien, J. K., Parker, M., Kelso, A. & Barr, I. G. Zanamivir-resistant influenza viruses with a novel neuraminidase mutation. *J Virol* 83, 10366-73 (2009).
 218. Gubareva, L. V. Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Res* 103, 199-203 (2004).
 219. Ito, T. et al. Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species. *Virology* 227, 493-9 (1997).
 220. Hughes, M. T., McGregor, M., Suzuki, T., Suzuki, Y. & Kawaoka, Y. Adaptation of influenza A viruses to cells expressing low levels of sialic acid leads to loss of neuraminidase activity. *J Virol* 75, 3766-70 (2001).
 221. Govorkova, E. A. et al. Selection of receptor-binding variants of human influenza A and B viruses in baby hamster kidney cells. *Virology* 262, 31-8 (1999).
 222. Thornton, D. J. et al. Characterization of mucins from cultured normal human tracheobronchial epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278, L1118-28 (2000).
 223. Thompson, C. I., Barclay, W. S., Zambon, M. C. & Pickles, R. J. Infection of human airway epithelium by human and avian strains of influenza A virus. *J Virol* 80, 8060-8 (2006).
 224. Kogure, T. et al. Human trachea primary epithelial cells express both sialyl(alpha2-3)Gal receptor for human parainfluenza virus type 1 and avian influenza viruses, and sialyl(alpha2-6)Gal receptor for human influenza viruses. *Glycoconj J* 23, 101-6 (2006).
 225. Gambaryan, A. S. et al. Receptor-binding properties of swine influenza viruses isolated and propagated in MDCK cells. *Virus Res* 114, 15-22 (2005).
 226. Gamblin, S. J. et al. The structure and receptor binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science* 303, 1838-42 (2004).
 227. Gambaryan, A. S. et al. Specification of receptor-binding phenotypes of influenza virus isolates from different hosts using synthetic sialylglycopolymers: non-egg-adapted human H1 and H3 influenza A and influenza B viruses share a common high binding affinity for 6'-sialyl(N-acetyllactosamine). *Virology* 232, 345-50 (1997).
 228. Matrosovich, M. et al. Early alterations of the receptor-binding properties of H1, H2, and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol* 74, 8502-12 (2000).
 229. Matrosovich, M. N. et al. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology* 233, 224-34 (1997).
 230. Aytay, S. & Schulze, I. T. Single amino acid substitutions in the hemagglutinin can alter the host range and receptor binding properties of H1 strains of influenza A virus. *J Virol* 65, 3022-8 (1991).
 231. Ohuchi, M., Ohuchi, R., Feldmann, A. & Klenk, H. D. Regulation of receptor binding affinity of influenza virus hemagglutinin by its carbohydrate moiety. *J Virol* 71, 8377-84 (1997).
 232. Morishita, T., Nobusawa, E., Nakajima, K. & Nakajima, S. Studies on the molecular basis for loss of the ability of recent influenza A (H1N1) virus strains to agglutinate chicken erythrocytes. *J Gen Virol* 77 (Pt 10), 2499-506 (1996).

233. Tisdale, M. Monitoring of viral susceptibility: new challenges with the development of influenza NA inhibitors. *Rev Med Virol* 10, 45-55 (2000).
234. Lee, J. H., Gramer, M. R. & Joo, H. S. Efficacy of swine influenza A virus vaccines against an H3N2 virus variant. *Can J Vet Res* 71, 207-12 (2007).
235. Richt, J. A. et al. Vaccination of pigs against swine influenza viruses by using an NS1-truncated modified live-virus vaccine. *J Virol* 80, 11009-18 (2006).
236. Vincent, A. L. et al. Efficacy of intranasal administration of a truncated NS1 modified live influenza virus vaccine in swine. *Vaccine* 25, 7999-8009 (2007).
237. Ning, Z. Y. et al. Detection of expression of influenza virus receptors in tissues of BALB/c mice by histochemistry. *Vet Res Commun* (2009).
238. Sidwell, R. W. & Smee, D. F. Experimental disease models of influenza virus infections: recent developments. *Drug Discov. Today Dis. Models* 1, 57-63 (2004).
239. Gambaryan, A. S. et al. Polymer-bound 6' sialyl-N-acetylactosamine protects mice infected by influenza virus. *Antiviral Res* 68, 116-23 (2005).
240. Smee, D. F., Wong, M. H., Bailey, K. W. & Sidwell, R. W. Activities of oseltamivir and ribavirin used alone and in combination against infections in mice with recent isolates of influenza A (H1N1) and B viruses. *Antivir Chem Chemother* 17, 185-92 (2006).
241. Sidwell, R. W. & Smee, D. F. In vitro and in vivo assay systems for study of influenza virus inhibitors. *Antiviral Res* 48, 1-16 (2000).
242. Smee, D. F., Wandersee, M. K., Wong, M. H., Bailey, K. W. & Sidwell, R. W. Treatment of mannan-enhanced influenza B virus infections in mice with oseltamivir, ribavirin and viremide. *Antivir Chem Chemother* 15, 261-8 (2004).
243. Belser, J. A. et al. Pathogenesis of pandemic influenza A (H1N1) and triple-reassortant swine influenza A (H1) viruses in mice. *J Virol* 84, 4194-203 (2010).
244. Vigerust, D. J. et al. N-linked glycosylation attenuates H3N2 influenza viruses. *J Virol* 81, 8593-600 (2007).
245. Govorkova, E. A. et al. Susceptibility of highly pathogenic H5N1 influenza viruses to the neuraminidase inhibitor oseltamivir differs in vitro and in a mouse model. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 3088-96 (2009).
246. Ison, M. G., Mishin, V. P., Braciale, T. J., Hayden, F. G. & Gubareva, L. V. Comparative activities of oseltamivir and A-322278 in immunocompetent and immunocompromised murine models of influenza virus infection. *J Infect Dis* 193, 765-72 (2006).
247. Ferrari, M. et al. Pathogenesis and Subsequent Cross-Protection of Influenza Virus Infection in Pigs Sustained by an H1N2 Strain. *Zoonoses Public Health* (2009).
248. Van Reeth, K., Van Gucht, S. & Pensaert, M. Investigations of the efficacy of European H1N1- and H3N2-based swine influenza vaccines against the novel H1N2 subtype. *Vet Rec* 153, 9-13 (2003).
249. Robertson, J. S. et al. Alterations in the hemagglutinin associated with adaptation of influenza B virus to growth in eggs. *Virology* 143, 166-74 (1985).
250. Robertson, J. S. et al. Structural changes in the haemagglutinin which accompany egg adaptation of an influenza A(H1N1) virus. *Virology* 160, 31-7 (1987).
251. Robertson, J. S. et al. The hemagglutinin of influenza B virus present in clinical material is a single species identical to that of mammalian cell-grown virus. *Virology* 179, 35-40 (1990).
252. Katz, J. M., Wang, M. & Webster, R. G. Direct sequencing of the HA gene of influenza (H3N2) virus in original clinical samples reveals sequence identity with mammalian cell-grown virus. *J Virol* 64, 1808-11 (1990).
253. Gambaryan, A. S., Robertson, J. S. & Matrosovich, M. N. Effects of egg-adaptation on the receptor-binding properties of human influenza A and B viruses. *Virology* 258, 232-9 (1999).

- 254. Stevens, J. et al. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *J Mol Biol* 355, 1143-55 (2006).
- 255. Chen, H. et al. Quasispecies of the D225G substitution in the hemagglutinin of pandemic influenza A(H1N1) 2009 virus from patients with severe disease in Hong Kong, China. *J Infect Dis* 201, 1517-21 (2010).
- 256. Sauter, N. K. et al. Crystallographic detection of a second ligand binding site in influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 324-8 (1992).
- 257. Rogers, G. N. & D'Souza, B. L. Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. *Virology* 173, 317-22 (1989).
- 258. Hayden, F. Developing new antiviral agents for influenza treatment: what does the future hold? *Clin Infect Dis* 48 Suppl 1, S3-13 (2009).
- 259. Belser, J. A. et al. DAS181, a novel sialidase fusion protein, protects mice from lethal avian influenza H5N1 virus infection. *J Infect Dis* 196, 1493-9 (2007).

Danksagung

Diese Dissertation wurde am Universitätsklinikum Jena am Institut für Virologie und Antivirale Therapie angefertigt.

An erster Stelle gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. Peter Wutzler als Leiter der Einrichtung für die Möglichkeit, diese Arbeit anfertigen zu können und seine Betreuung.

Besonderer Dank geht an PD Dr. Michaela Schmidtke für die motivierende Betreuung, ihre freundliche Begleitung und ihre Geduld und Hilfe in fachlicher und persönlicher Hinsicht.

Einen großen Anteil am Gelingen dieser Dissertation hatte die außergewöhnliche Arbeitsatmosphäre in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Michaela Schmidtke. Ich danke Birgit Jahn, Heike Braun und Martina Richter. Ich habe sehr gern mit euch zusammengearbeitet.

Ebenso möchte ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für die gute Zusammenarbeit bedanken, vor allem bei Dr. Eckhardt Birch-Hirschfeld für die Synthese der Primer, Dr. Michael Schacke und Veronika Güntzschel für die Bereitstellung der Zellkulturen, Dr. Brigitte Glück und Birgit Meißner für ihre Unterstützung bei den Tierexperimenten sowie Prof. Dr. Andreas Henke und Prof. Dr. Roland Zell und ihren Arbeitsgruppen für die Kooperation und hilfreichen Hinweise bei experimentellen Problemen.

Weiterhin danke ich Dr. Ralf Dürrwald (IDT Biologika GmbH Dessau-Roßlau) für die Durchführung der antiviralen Testung im Schwein, Prof. Dr. Karin Klingel (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Tübingen) für die *In situ*-Hybridisierung und Dr. Hans-Martin Dahse (Leibnitz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e.V. – Hans-Knöll-Institut Jena) für seine Unterstützung bei den FACS-Analysen.

Meinem Mann Daniel Bauer möchte ich an dieser Stelle ganz besonders danken – für seine Liebe, Motivation und geduldige Unterstützung.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die aktuelle Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen.

Die vorliegende Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Prüfungsbehörde oder Hochschule eingereicht.

Ich habe weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des akademischen Grades *Doctor rerum naturalium* an einer anderen Hochschule beantragt.

Jena, 09. Dezember 2010

.....

Katja Bauer